

19

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 977 721**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)
C07H 15/08 (2006.01)
C07H 21/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/54 (2007.01)
C07D 207/404 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2022** **PCT/EP2022/052067**
87 Fecha y número de publicación internacional: **04.08.2022** **WO22162153**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2022** **E 22704881 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 4175965**

54 Título: **Compuestos de oligonucleótidos conjugados, métodos de preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

30.01.2021 US 202163143805 P
08.10.2021 US 202163262311 P
25.10.2021 US 202163271686 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.08.2024

73 Titular/es:

E-THERAPEUTICS PLC (100.0%)
Unit 4B, Level 44 Kingdom Street
London W2 6BD, GB

72 Inventor/es:

MORTAZAVI, AHMAD ALI;
MANNELLA, VIVIANA y
JAYARAMAN, MUTHUSAMY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 977 721 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos de oligonucleótidos conjugados, métodos de preparación y usos de los mismos

Campo

- 5 La presente invención proporciona nuevos compuestos de oligonucleótidos conjugados, que son adecuados para uso terapéutico. Además, la presente descripción proporciona métodos para preparar estos compuestos, así como métodos para usar dichos compuestos para el tratamiento de diversas enfermedades y condiciones.

Antecedentes

- 10 Los compuestos oligonucleotídicos tienen importantes aplicaciones terapéuticas en medicina. Los oligonucleótidos se pueden usar para silenciar genes que son responsables de una enfermedad particular. El silenciamiento de genes previene la formación de una proteína al inhibir la traducción. Es importante destacar que los agentes silenciadores de genes son una alternativa prometedora a los pequeños compuestos orgánicos tradicionales que inhiben la función de la proteína vinculada a la enfermedad. El ARNip, el ARN antisentido y el microARN son oligonucleótidos que previenen la formación de proteínas mediante el silenciamiento de genes.

- 15 En particular, en las últimas dos décadas se han desarrollado varios compuestos de ARNip modificados con fines diagnósticos y terapéuticos, incluidos agentes terapéuticos de ARNip/ARNi para el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas enfermedades del sistema nervioso central, enfermedades inflamatorias, trastornos metabólicos, oncología, enfermedades infecciosas y enfermedades oculares.

- 20 La distribución eficiente de los oligonucleótidos a las células *in vivo* requiere un direccionamiento específico y una protección sustancial del entorno extracelular, particularmente de las proteínas séricas. Un método para lograr un direccionamiento específico es conjugar un resto dirigido al ligando con el agente oligonucleotídico. El resto dirigido al ligando ayuda a distribuir el oligonucleótido al sitio objetivo requerido. Por ejemplo, unir un resto dirigido al ligando que comprende una galactosa terminal o un derivado de la misma a un oligonucleótido ayuda a dirigirse a los hepatocitos mediante la unión al receptor de asialoglicoproteína (ASGPR).

Existe la necesidad de nuevos oligonucleótidos conjugados con ligando y métodos para su preparación.

- 25 La patente internacional WO2014/179620 describe compuestos oligoméricos con grupos conjugados, y en particular compuestos oligoméricos conjugados con N-acetilgalactosamina.

La patente internacional WO2014/179626 describe compuestos oligoméricos con grupos conjugados dirigidos a la apolipoproteína C-III (ApoCIII), y en particular, compuestos oligoméricos dirigidos a ApoCIII conjugados con N-acetilgalactosamina.

- 30 La patente internacional WO2015/042447 describe compuestos que comprenden uno o más nucleósidos terapéuticos y uno o más grupos de direccionamiento, y en particular, compuestos que comprenden además uno o más oligonucleótidos y grupos de direccionamiento que comprenden una o más N-acetilgalactosamina.

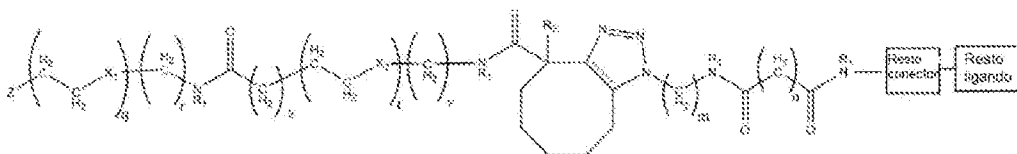
La patente internacional WO2020/172755 describe grupos de ligandos y métodos para su uso y preparación.

- 35 La patente internacional WO2020/097342 describe polímeros que son polímeros oligonucleotídicos que inhiben el transporte del antígeno S, procesos para fabricarlos y métodos para usarlos para tratar enfermedades y condiciones.

Compendio

La invención es tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención proporciona nuevos compuestos oligonucleotídicos conjugados con ligando y sus usos. En lo sucesivo, cualquier referencia a la presente descripción debe entenderse como realizada únicamente con fines de referencia.

- 40 En la presente memoria se proporciona un compuesto que comprende la siguiente estructura:



Fórmula (I)

En donde:

R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

R₂ es F;

X₁ y X₂ en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

5 m es un número entero de 1 a 6;

n es un número entero de 1 a 10;

q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

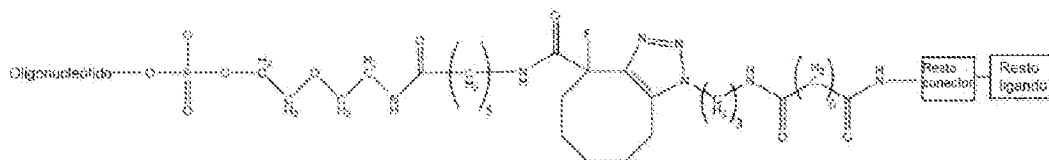
(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

(ii) s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

10 Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1; y

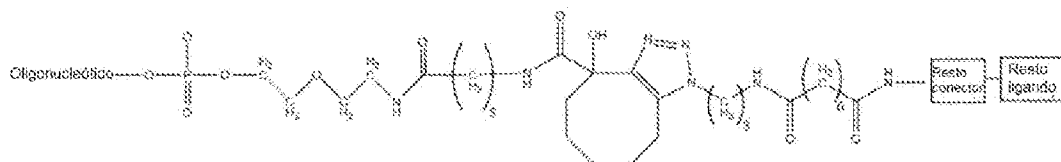
El resto conector y el resto ligando también son como se definen en la reivindicación 1.

En la presente memoria se proporciona un compuesto de Fórmula (II):



Fórmula (II)

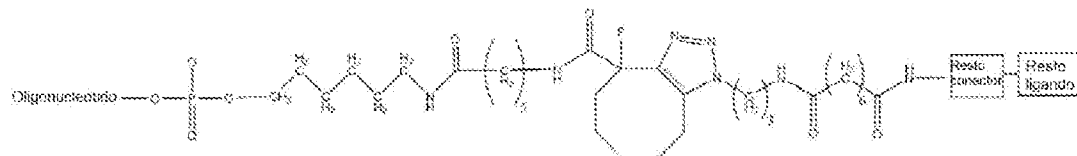
15 en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1. En la presente memoria se proporciona una composición que comprende un compuesto de Fórmula (II) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y un compuesto de Fórmula (III) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria:



Fórmula (III)

en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1.

En la presente memoria se proporciona un compuesto de Fórmula (IV):

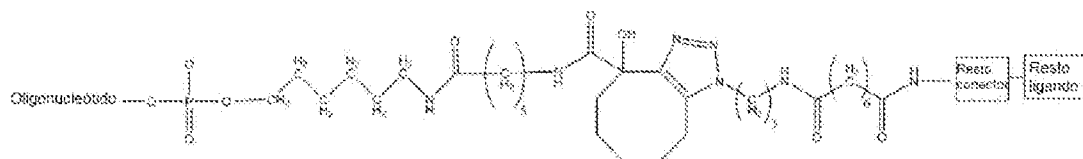


Fórmula (IV)

20

en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1.

En la presente memoria se proporciona una composición que comprende un compuesto de Fórmula (IV) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y un compuesto de Fórmula (V) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria:

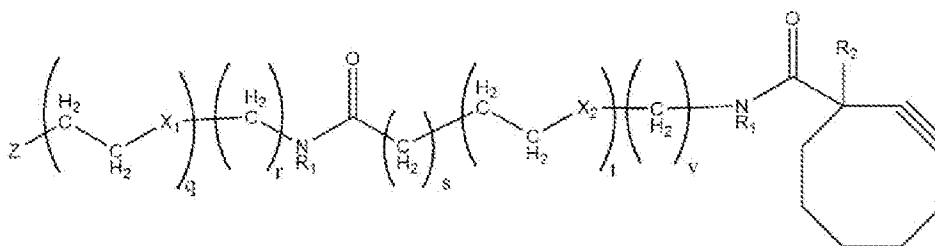


Fórmula (V)

5 en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1.

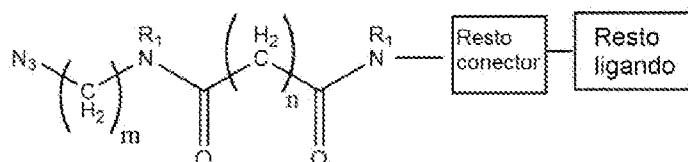
Los compuestos específicos según la invención se definen en las reivindicaciones.

La descripción en la presente memoria proporciona un proceso para preparar un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, que comprende hacer reaccionar compuestos de Fórmulas (XII) y (XIII):



Fórmula (XII)

10



Fórmula (XIII)

en donde:

R_1 en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

 R_2 es F ;

15 X_1 y X_2 en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

m es un número entero de 1 a 6;

n es un número entero de 1 a 10:

q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

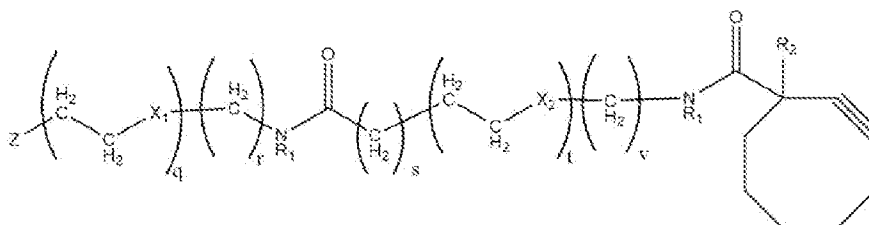
20 (ii) s , t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1;

El resto conector y el resto ligando también son como se definen en la reivindicación 1 y en las reivindicaciones posteriores;

y cuando sea apropiado se lleva a cabo la desprotección del ligando y/o la hibridación de una segunda hebra para el resto oligonucleótido.

- 5 La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XII):



Fórmula (XII)

en donde:

R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

R₂ es F;

- 10 X₁ y X₂ en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

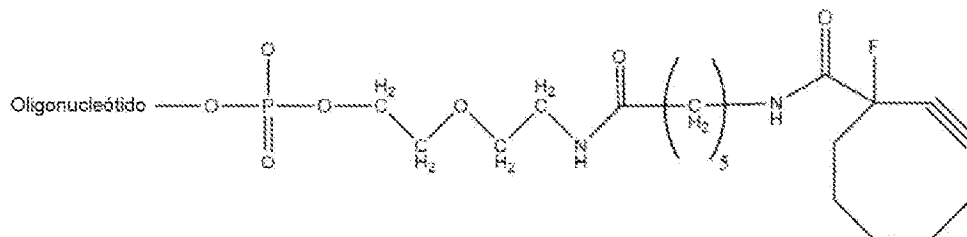
(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

(ii) s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1; y

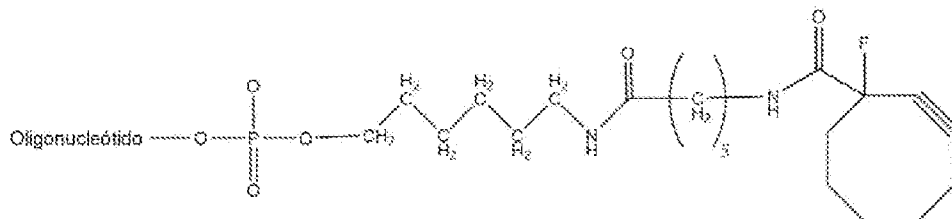
- 15 El resto conector y el resto ligando también se definen en la reivindicación 1 y en las reivindicaciones posteriores.

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XIIa):



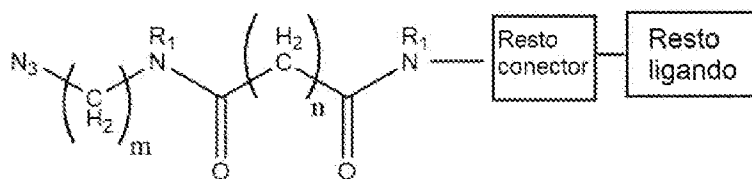
Fórmula (XIIa)

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XIIc):



Fórmula (XIIc)

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XIII):



Fórmula (XIII)

en donde:

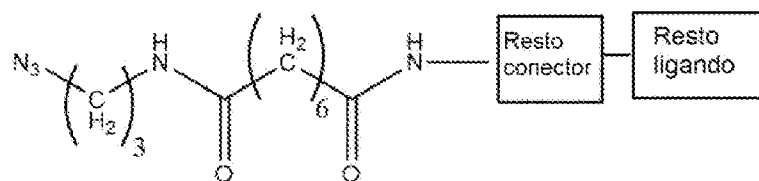
R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

5 m es un número entero de 1 a 6;

n es un número entero de 1 a 10; y

en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1 y reivindicaciones posteriores.

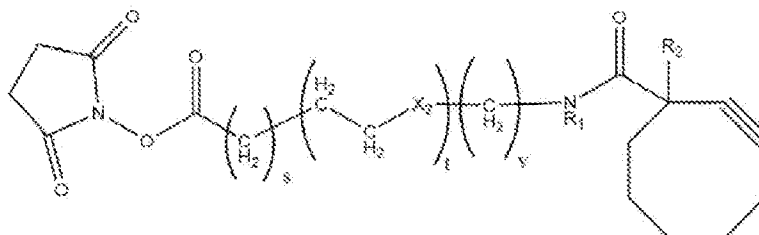
La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XIIIa):



Fórmula (XIIIa)

10 en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1 y reivindicaciones posteriores.

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XIV):



Fórmula (XIV)

en donde:

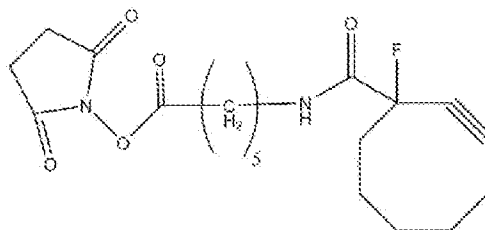
R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

15 R₂ es F;

X₂ se selecciona del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

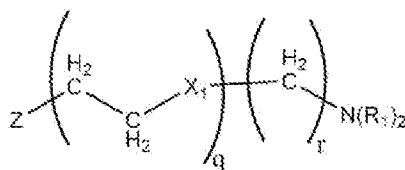
s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo.

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XIVa):



Fórmula (XIVa)

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XV)



Fórmula (XV)

5 en donde:

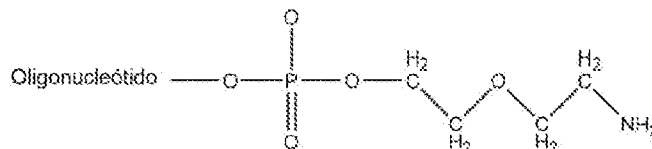
R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

X₁ se selecciona del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

q y r son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que q y r no puedan ser ambos 0 al mismo tiempo;

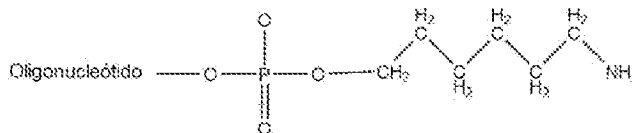
10 Z es un resto oligonucleótido.

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de fórmula (XVa):



Fórmula (XVa)

La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto de Fórmula (XVb):



Fórmula (XVb)

15 La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XII) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

20 La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XIII) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XIV) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

5 La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XV) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XIIa) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

10 La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XIIc) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

15 La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XIIIa) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XIVa) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

20 La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XVa) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La descripción en la presente memoria proporciona el uso de un compuesto de Fórmula (XVb) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

25 La descripción en la presente memoria proporciona un compuesto o composición obtenido, o que puede obtenerse mediante un proceso como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La descripción en la presente memoria proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 Se proporciona en la presente memoria un compuesto como se describe en las reivindicaciones y/o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para uso en terapia.

Breve descripción de las figuras

El alcance de la presente invención es como se define por las reivindicaciones. Cualquier figura fuera del alcance de estas reivindicaciones se incluye como referencia.

35 La FIG. 1 muestra el análisis de los niveles de expresión del ARNm de hsC5 en un total de 45 lisados de células cancerosas de origen humano y lisados de hepatocitos humanos primarios (PHH). Los niveles de expresión de ARNm se muestran en unidades de luz relativas [RLU].

40 La FIG. 2 muestra el análisis de los niveles de expresión del ARNm de hsHAO1 en un total de 45 lisados de células cancerosas de origen humano y lisados de hepatocitos humanos primarios (PHH). Los niveles de expresión de ARNm se muestran en unidades de luz relativas [RLU].

La FIG. 3 muestra el análisis de los niveles de expresión de ARNm de hsTTR en un total de 45 lisados de células cancerosas de origen humano y lisados de hepatocitos humanos primarios (PHH). Los niveles de expresión de ARNm se muestran en unidades de luz relativas [RLU].

45 Las FIGs. 4A-D muestra los resultados del análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hsTTR en células HepG2 en el Ejemplo 1.

Las FIGs. 5A-D muestra los resultados del análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hsC5 en células HepG2 en el Ejemplo 1.

50 La FIG. 6 muestra el análisis de los niveles de expresión de ARNm de hsTTR (arriba), hsC5 (centro) y hsHAO1 (abajo) en los tres lotes de hepatocitos humanos primarios BHuf16087 (izquierda), CHF2101 (centro) y CyHuf19009 (derecha) cada uno después de 0 h, 24 h, 48 h y 72h en cultivo. Los niveles de expresión de ARNm se muestran en unidades de luz relativas [RLU].

La FIG. 7 muestra el análisis de los niveles de expresión de ARNm de hsGAPDH (arriba) y hsAHSA1 (abajo) en los tres lotes de hepatocitos humanos primarios BHuf16087 (izquierda), CHF2101 (centro) y CyHuf19009 (derecha) cada uno después de 0 h, 24 h, 48 h y 72 h en cultivo. Los niveles de expresión de ARNm se muestran en unidades de luz relativas [RLU].

- 5 Las FIGs. 8A-D muestra los resultados del análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigido a hsHAO1 en PHH en el Ejemplo 1.

Las FIGs. 9A-D muestra los resultados del análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigido a hsC5 en PHH en el Ejemplo 1.

- 10 Las FIGs. 10A-D muestra los resultados del análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigido a hsTTR en PHH en el Ejemplo 1.

FIG. 11 Farmacología en ratón de dosis única de ETX005. La expresión del ARNm de HAO1 se muestra en relación con el grupo de control de disolución salina. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 ratones.

- 15 FIG. 12 Farmacología en ratón de dosis única de ETX005. Se muestra la concentración de glicolato sérico. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 ratones, excepto la concentración inicial de glicolato (día 0) que se derivó de un grupo de 5 ratones.

FIG. 13 Farmacología en ratón de dosis única de ETX014. La expresión del ARNm de C5 se muestra en relación con el grupo de control de disolución salina. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 ratones.

FIG. 14 Farmacología en ratón de dosis única de ETX0014. La concentración sérica de C5 se muestra en relación con el grupo de control de disolución salina. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 ratones.

- 20 FIG. 15. Farmacología en NHP de dosis única de ETX023. La concentración sérica de TTR se muestra en relación con el día 1 del estudio. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales.

FIG. 16. Farmacología en NHP de dosis única de ETX019. La concentración sérica de TTR se muestra en relación con el día 1 del estudio y también antes de la dosis. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Se muestran los puntos temporales hasta 84 días.

- 25 FIG. 17. Farmacología en NHP de dosis única de ETX021. La concentración sérica de TTR se muestra en relación con el día 1 del estudio y también antes de la dosis. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

- 30 FIG. 18a. Farmacología en NHP de dosis única de ETX023. La concentración sérica de TTR se muestra en relación con el día 1 del estudio y también antes de la dosis. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

FIG. 18b. Supresión sostenida de la expresión del gen TTR en el hígado después de una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. El ARNm de TTR se muestra en relación con los niveles iniciales medidos antes de la dosis. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

- 35 FIG. 18c. Peso corporal de los animales dosificados con una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

- 40 FIG. 18d Concentración de ALT en suero de animales tratados con una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Los sombreados muestran el intervalo de valores considerados normales en la instalación usada para el estudio. Las líneas punteadas muestran los valores considerados normales para esta especie (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.) Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

- 45 FIG 18e. Concentración de AST en suero de animales tratados con una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Los sombreados muestran el intervalo de valores considerados normales en la instalación usada para el estudio. Las líneas punteadas muestran valores considerados normales para esta especie (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86. Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

FIG. 19. Farmacología en NHP de dosis única de ETX025. La concentración sérica de TTR se muestra en relación con el día 1 del estudio y también antes de la dosis. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Se muestran puntos temporales de hasta 84 días.

- 50 FIG. 20. Resto conector y ligando para ETX005, 007, 0014, 0016, 0023 y 0025.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX025 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 20 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX025 puede comprender además moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representa en la FIG. 20 unidas a un resto oligonucleótido pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 20 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX025 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 20, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX025 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 30 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 20 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH.

FIG. 21. Resto conector y ligando para ETX003, 001, 0010, 0012, 0019 y 0021.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX001 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX001 puede comprender además alternativamente moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representan en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido pero con que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX001 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX001 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 21 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo de ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX003 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX003 puede comprender además alternativamente moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representan en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX003 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX003 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 21 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo de ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX010 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX010 puede comprender además alternativamente moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representan en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido pero con que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX010 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX010 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 21 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo de ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX012 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX012 puede comprender además alternativamente moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representan en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido pero con que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX012 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX012 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 21 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo de ciclooctilo sustituido por un sustituyente que ocurre como resultado de un desplazamiento hidrolítico, como un sustituyente OH.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX019 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX019 puede comprender además alternativamente moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representan en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX019 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX019 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 30 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo de ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH.

También debe entenderse que, cuando sea apropiado, mientras que ETX021 como producto incluye moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, este producto ETX021 puede comprender además alternativamente moléculas en donde las porciones de conector y ligando son esencialmente como se representan en la FIG. 21 unidas a un resto oligonucleótido pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) ETX021 puede consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la FIG. 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) ETX021 puede comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) junto con moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG. 21 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG. 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH.

FIG. 22 Concentración de bilirrubina total en suero de animales tratados con una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Las líneas de puntos muestran el intervalo de valores considerados normales para esta especie (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

FIG. 23. Concentración de nitrógeno ureico en sangre (BUN) de animales tratados con una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Las líneas de puntos muestran el intervalo de valores considerados normales para esta especie (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

FIG. 24. Concentración de creatinina (CREA) de animales tratados con una dosis única de 1 mg/kg de ETX023. Cada punto representa la media y la desviación estándar de 3 animales. Las líneas de puntos muestran el intervalo de valores considerados normales para esta especie (Park et al. 2016 Reference values of clinical pathology parameter in cynomolgus monkeys used in preclinical studies. Lab Anim Res 32:79-86.)

Las FIGs. 25 - 27 se describen en detalle a continuación.

La FIG. 28 muestra el detalle de las fórmulas I a XV a continuación.

La FIG. 29a muestra las secuencias de nucleótidos subyacentes para las hebras sentido (SS) y antisentido (AS) del constructo ETX001 como se describe en la presente memoria. Para ETX001, se une un conector galnac a la región del extremo 5' de la hebra sentido en uso (no representada en la Figura 29a). Para ETX001, el conector galnac está conectado y como se muestra en la Figura 21. La referencia a la Figura 29a en los párrafos siguientes es una referencia a la secuencia, el diseño del constructo y el patrón de modificación de ETX001.

iaia como se muestra en la región del extremo 3' de la hebra sentido en la Figura 29a representa (i) dos nucleótidos abásicos proporcionados como nucleótidos penúltimo y terminal en la región del extremo 3' de la hebra sentido, (ii) en donde se proporciona un enlace inverso 3'-3' entre el antepenúltimo nucleótido (es decir, A en la posición 21 de la hebra sentido, en donde la posición 1 es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente G terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido) y el penúltimo residuo abásico adyacente de la hebra sentido, y (iii) el enlace entre los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo es 5'-3' cuando se lee hacia la región del extremo 3' que comprende los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo.

Para la hebra sentido de la Figura 29a, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra sentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente G terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1 a 6, 8 y 12 a 21 tienen azúcares modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 7 y 9 a 11 tienen azúcares modificados con 2' F, (iii) los nucleótidos abásicos tienen azúcares que tienen H en las posiciones 1 y 2.

Para la hebra antisentido de la Figura 29a, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra antisentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra antisentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 10 a 13, 15, 17 a 23 tienen azúcares que están

modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14, 16 tienen azúcares que están modificados con 2' F.

ETX003 como se describe en la presente memoria tiene la misma secuencia subyacente y conector galnac y unión como se representa para ETX001 en la Figura 29a, pero sin el motivo iaia terminal y con un patrón de modificación 2' O-metilo/2'F completamente alterno en los azúcares de los nucleótidos. Para la hebra sentido, el patrón de modificación completamente alternante comienza con una modificación 2'F en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra sentido. Para la hebra antisentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2' O-metilo en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra antisentido.

La Figura 29b muestra las secuencias de nucleótidos subyacentes para las hebras sentido (SS) y antisentido (AS) del constructo ETX005 como se describe en la presente memoria. Para ETX005, se une un conector galnac a la región del extremo 3' de la hebra sentido en uso (no representada en la Figura 29b). Para ETX005, el conector galnac está conectado y como se muestra en la Figura 20. La referencia a la Figura 29b en los párrafos siguientes es una referencia a la secuencia, el diseño del constructo y el patrón de modificación de ETX005.

iaia como se muestra en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la Figura 29b representa (i) dos nucleótidos abásicos proporcionados como nucleótidos penúltimo y terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido, (ii) en donde se proporciona un enlace inverso 5'-5' entre el antepenúltimo nucleótido (es decir, G en la posición 1 de la hebra sentido, sin incluir el motivo iaia en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la numeración de posiciones de nucleótidos en la hebra sentido) y el penúltimo residuo abásico adyacente de la hebra sentido, y (iii) el enlace entre los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo es 3'-5' cuando se lee hacia la región del extremo 5' que comprende los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo.

Para la hebra sentido de la Figura 29b, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra sentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente G terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido, sin incluir el motivo iaia en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la numeración de posición de nucleótido en la hebra sentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1 a 6, 8 y 12 a 21 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 7 y 9 a 11 tienen azúcares que están modificados en 2' F, (iii) los nucleótidos abásicos tienen azúcares que tienen H en las posiciones 1 y 2.

Para la hebra antisentido de la Figura 29b, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra antisentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra antisentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 10 a 13, 15, 17 a 23 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 2, 6, 8, 9, 14, 16 tienen azúcares que están modificados con 2' F.

ETX007 como se describe en la presente memoria tiene la misma secuencia subyacente y conector galnac y unión como se representa para ETX005 en la Figura 29b, pero sin el motivo iaia terminal y con un patrón de modificación 2' O-metilo/2'F completamente alterno en los azúcares de los nucleótidos. Para la hebra sentido, el patrón de modificación completamente alternante comienza con una modificación 2'F en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra sentido. Para la hebra antisentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2' O-metilo en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra antisentido.

La Figura 30a muestra las secuencias de nucleótidos subyacentes para las hebras sentido (SS) y antisentido (AS) del constructo ETX010 como se describe en la presente memoria. Para ETX010, se une un conector galnac a la región del extremo 5' de la hebra sentido en uso (no representada en la Figura 30a). Para ETX010, el conector galnac está conectado y es como se muestra en la Figura 21. La referencia a la Figura 30a en los párrafos siguientes es una referencia a la secuencia, el diseño del constructo y el patrón de modificación de ETX010.

iaia como se muestra en la región del extremo 3' de la hebra sentido en la Figura 30a representa (i) dos nucleótidos abásicos proporcionados como nucleótidos penúltimo y terminal en la región del extremo 3' de la hebra sentido, (ii) en donde se proporciona un enlace inverso 3'-3' entre el antepenúltimo nucleótido (es decir, A en la posición 21 de la hebra sentido, en donde la posición 1 es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente la A terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido) y el penúltimo residuo abásico adyacente de la hebra sentido, y (iii) el enlace entre los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo es 5'-3' cuando se lee hacia la región del extremo 3' que comprende los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo.

Para la hebra sentido de la Figura 30a, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra sentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente la A terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17, 19 a 21 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 16, 18 tienen azúcares que están modificados en 2' F, (iii) los nucleótidos abásicos tienen azúcares que tienen H en las posiciones 1 y 2.

Para la hebra antisentido de la Figura 30a, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra antisentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra antisentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 4, 6, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, 19 a 23 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16, 18 tienen azúcares que

están modificados con 2' F, (iii) los nucleótidos T penúltimo y terminal en las posiciones 24, 25 en la región del extremo 3' de la hebra antisentido tienen azúcares que tienen H en la posición 2.

ETX012 como se describe en la presente memoria tiene la misma secuencia subyacente y el conector galnac y la unión como se representa para ETX010 en la Figura 30a, pero sin el motivo iaia terminal y con un patrón de modificación 2' O-metilo/2'F completamente alterno en los azúcares de los nucleótidos (a excepción de los nucleótidos T terminales que tienen H en la posición 2). Para la hebra sentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2'F en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra sentido. Para la hebra antisentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2' O-metilo en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra antisentido.

La Figura 30b muestra las secuencias de nucleótidos subyacentes para las hebras sentido (SS) y antisentido (AS) del constructo ETX014 como se describe en la presente memoria. Para ETX014, se une un conector galnac a la región del extremo 3' de la hebra sentido en uso (no representada en la Figura 30b). Para ETX014, el conector galnac está conectado y es como se muestra en la Figura 20. La referencia a la Figura 30b en los párrafos siguientes es una referencia a la secuencia, el diseño del constructo y el patrón de modificación de ETX014.

iaia como se muestra en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la Figura 30b representa (i) dos nucleótidos abásicos proporcionados como nucleótidos penúltimo y terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido, (ii) en donde se proporciona un enlace inverso 5'-5' entre el antepenúltimo nucleótido (concretamente A en la posición 1 de la hebra sentido, sin incluir el motivo iaia en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la numeración de posiciones de nucleótidos en la hebra sentido) y el penúltimo residuo abásico adyacente de la hebra sentido, y (iii) el enlace entre los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo es 3'-5' cuando se lee hacia la región del extremo 5' que comprende los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo.

Para la hebra sentido de la Figura 30b, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra sentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente la A terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido, sin incluir el motivo iaia en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la numeración de la posición del nucleótido en la hebra sentido), luego: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 2, 4, 6, 8, 12, 14, 15, 17, 19 a 21 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 3, 5, 7, 9 a 11, 13, 16, 18 tienen azúcares que están modificados con 2' F, (iii) los nucleótidos abásicos tienen azúcares que tienen H en las posiciones 1 y 2.

Para la hebra antisentido de la Figura 30b, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra antisentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra antisentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 4, 6, 7, 9, 11 a 13, 15, 17, 19 a 23 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 2, 3, 5, 8, 10, 14, 16, 18 tienen azúcares que están modificados con 2' F, (iii) los nucleótidos T penúltimo y terminal en las posiciones 24, 25 en la región del extremo 3' de la hebra antisentido tienen azúcares que tienen H en la posición 2.

ETX016 como se describe en la presente memoria tiene la misma secuencia subyacente y el conector galnac y la unión como se representa para ETX014 en la Figura 30b, pero sin el motivo iaia terminal y con un patrón de modificación 2' O-metilo/2'F completamente alterno en los azúcares de los nucleótidos (a excepción de los nucleótidos T terminales que tienen H en la posición 2). Para la hebra sentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2'F en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra sentido. Para la hebra antisentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2' O-metilo en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra antisentido.

La FIG 31a muestra las secuencias de nucleótidos subyacentes para las hebras sentido (SS) y antisentido (AS) del constructo ETX019 como se describe en la presente memoria. Para ETX019, se une un conector galnac a la región del extremo 5' de la hebra sentido en uso (no representada en la Figura 31a). Para ETX019, el conector galnac está conectado y es como se muestra en la Figura 21. La referencia a la Figura 31a en los párrafos siguientes es una referencia a la secuencia, el diseño del constructo y el patrón de modificación de ETX019.

iaia como se muestra en la región del extremo 3' de la hebra sentido en la Figura 31a representa (i) dos nucleótidos abásicos proporcionados como nucleótidos penúltimo y terminal en la región del extremo 3' de la hebra sentido, (ii) en donde se proporciona un enlace inverso 3'-3' entre el antepenúltimo nucleótido (concretamente A en la posición 21 de la hebra sentido, en donde la posición 1 es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido) y el penúltimo residuo abásico adyacente de la hebra sentido, y (iii) el enlace entre los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo es 5'-3' cuando se lee hacia la región del extremo 3' que comprende los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo.

Para la hebra sentido de la Figura 31a, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra sentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1 a 6, 8 y 12 a 21 tienen azúcares modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 7 y 9 a 11 tienen azúcares que están modificados con 2' F, (iii) los nucleótidos abásicos tienen azúcares que tienen H en las posiciones 1 y 2.

Para la hebra antisentido de la Figura 31a, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra antisentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra antisentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 8, 10 a 13, 15, 17 a 23 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 2, 6, 9, 14, 16 tienen azúcares que están modificados con 2' F.

ETX021 como se describe en la presente memoria tiene la misma secuencia subyacente y el conector galnac y la unión como se representa para ETX019 en la Figura 31a, pero sin el motivo iaia terminal y con un patrón de modificación 2' O-metilo/2'F completamente alterno en los azúcares de los nucleótidos. Para la hebra sentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2'F en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra sentido. Para la hebra antisentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2' O-metilo en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra antisentido.

La Figura 31b muestra las secuencias de nucleótidos subyacentes para las hebras sentido (SS) y antisentido (AS) del constructo ETX023 como se describe en la presente memoria. Para ETX023, se une un conector galnac a la región del extremo 3' de la hebra sentido en uso (no se representa en la Figura 31b). Para ETX023, el conector galnac está unido y es como se muestra en la Figura 20. La referencia a la Figura 31b en los párrafos siguientes es una referencia a la secuencia, el diseño del constructo y el patrón de modificación de ETX023.

iaia como se muestra en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la Figura 31b representa (i) dos nucleótidos abásicos proporcionados como nucleótidos penúltimo y terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido, (ii) en donde se proporciona un enlace inverso 5'-5' entre el antepenúltimo nucleótido (concretamente la U en la posición 1 de la hebra sentido, sin incluir el motivo iaia en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la numeración de posiciones de nucleótidos en la hebra sentido) y el penúltimo residuo abásico adyacente de la hebra sentido, y (iii) el enlace entre los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo es 3'-5' cuando se lee hacia la región del extremo 5' que comprende los nucleótidos abásicos terminal y penúltimo.

Para la hebra sentido de la Figura 31b, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra sentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra sentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra sentido, sin incluir el motivo iaia en la región del extremo 5' de la hebra sentido en la numeración de la posición de nucleótido en la hebra sentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1 a 6, 8 y 12 a 21 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 7 y 9 a 11 tienen azúcares que están modificados con 2' F, (iii) los nucleótidos abásicos tienen azúcares que tienen H en las posiciones 1 y 2.

Para la hebra antisentido de la Figura 31b, cuando se lee desde la posición 1 de la hebra antisentido (que es el nucleótido 5' terminal de la hebra antisentido, concretamente la U terminal en la región del extremo 5' de la hebra antisentido), entonces: (i) los nucleótidos en las posiciones 1, 3 a 5, 7, 8, 10 a 13, 15, 17 a 23 tienen azúcares que están modificados con 2' O-metilo, (ii) los nucleótidos en las posiciones 2, 6, 9, 14, 16 tienen azúcares modificados con 2' F.

ETX025 como se describe en la presente memoria tiene la misma secuencia subyacente y el conector galnac y la unión como se representa para ETX023 en la Figura 31b, pero sin el motivo iaia terminal y con un patrón de modificación 2' O-metilo/2'F completamente alterno en los azúcares de los nucleótidos. Para la hebra sentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2'F en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra sentido. Para la hebra antisentido, el patrón de modificación completamente alterno comienza con una modificación 2' O-metilo en la posición 1 en la región del extremo 5' de la hebra antisentido.

Descripción detallada

La presente invención proporciona nuevos compuestos oligonucleotídicos conjugados con ligando y sus usos.

Los compuestos de la invención comprenden un resto oligonucleótido, un conector y un resto ligando como se define en la reivindicación 1. Estos restos pueden estar unidos covalentemente entre sí, de modo que el resto oligonucleótido esté unido covalentemente al resto ligando a través del conector.

Se entenderá que los compuestos descritos en la presente memoria pueden combinar cualquier resto oligonucleótido como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o cualquier conector como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y/o cualquier resto ligando como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

1. Resto ligando

Los compuestos de la invención comprenden un "resto ligando", como se representa en la Fórmula (I), como se define en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, el resto ligando como se representa en la Fórmula (I) comprende uno o más ligandos como se define en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones, el resto ligando como se representa en la Fórmula (I) comprende uno o más ligandos carbohidrato como se define en la reivindicación 1.

En la presente invención, uno o más carbohidratos comprenden uno o más restos de N-acetil-galactosamina.

5 En la presente invención, los compuestos descritos en cualquier lugar de la presente memoria comprenden dos o tres restos de N-acetilgalactosamina.

Uno o más ligandos pueden unirse en una configuración lineal como se describe en la presente memoria, o en una configuración ramificada según la presente invención, estando unida por ejemplo cada configuración respectivamente a un punto de ramificación en un conector general.

10 La configuración lineal ejemplar descrita en la presente memoria, o configuraciones ramificadas de la invención, de restos ligando se pueden representar de la siguiente manera, usando la nomenclatura como se explica con más detalle en las secciones 2, 3 y 4 más adelante.

La configuración lineal ejemplar descrita en la presente memoria se muestra en la Figura 32, en donde (a) y/o (b) normalmente pueden representar enlaces o grupos de conexión, tales como grupos fosfato o fosforotioato.

En la Figura 33 se muestra una configuración ramificada ejemplar.

15 En algunas realizaciones, el uno o más ligandos están unidos como una configuración ramificada biantenaria o triantenaria. Normalmente, se puede preferir una configuración ramificada triantenaria, tal como una configuración ramificada triantenaria de N-acetilgalactosamina.

2. Conector

20 Los compuestos de la invención comprenden un "resto conector", como se representa en la Fórmula (I) como se define en la reivindicación 1, que es parte de un "conector" general.

Como se entenderá mejor en la técnica, los compuestos de la invención comprenden un conector general que está ubicado entre el resto oligonucleótido y el resto ligando de estos compuestos. El conector general "conecta" de ese modo el resto oligonucleótido y el resto ligando entre sí.

25 A menudo se considera teóricamente que el conector general comprende uno o más bloques de construcción del conector. Por ejemplo, hay una porción conectora que se representa como el "resto conector" como se representa en la Fórmula (I) colocada adyacente al resto ligando y uniendo el resto ligando, normalmente a través de un punto de ramificación, directa o indirectamente al resto oligonucleótido. El resto conector como se representa en la Fórmula (I) también puede denominarse a menudo "brazo o brazos de ligando" del conector general. También puede haber, aunque no siempre, una porción conectora adicional entre el resto oligonucleótido y el punto de ramificación, que a
30 menudo se denomina "resto de unión" del conector general, que "une" el resto oligonucleótido al resto del compuesto conjugado. Dichos "brazos de ligando" y/o "restos conectores" y/o "restos de unión" pueden preverse con referencia a las configuraciones lineales y/o ramificadas como se establece anteriormente.

Como puede verse en las reivindicaciones y en el recordatorio de la memoria de la patente, el alcance de la presente invención se extiende a configuraciones ramificadas.

35 El resto del conector general (distinto del resto conector) tal como se establece en las reivindicaciones, y el resto de la especificación de la patente, se muestra por sus constituyentes químicos en la Fórmula (I), que los inventores consideran particularmente única para el invención actual. Sin embargo, en términos más generales, estos constituyentes químicos podrían describirse como un "resto de unión" como se describió anteriormente, en donde el "resto de unión" es esa porción del conector general que comprende el grupo de átomos entre Z, concretamente el
40 resto oligonucleótido y el resto conector como se representa en la Fórmula (I).

2.1 Resto de unión

En relación con la Fórmula (I), el "resto de unión" comprende el grupo de átomos entre Z, concretamente el resto oligonucleótido, y el resto conector.

45 En algunas realizaciones, R₁ es hidrógeno en cada aparición. En algunas realizaciones, R₁ es metilo. En algunas realizaciones, R₁ es etilo. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es hidroxilo. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es halo. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es flúor. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es cloro. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es bromo. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es yodo. En algunas realizaciones como se proporciona por la descripción en la presente memoria, R₂ es nitrógeno. Según la presente invención como se define en la reivindicación
50 1, R₂ es flúor.

En algunas realizaciones, X_1 es metileno. En algunas realizaciones, X_1 es oxígeno. En algunas realizaciones, X_1 es azufre.

En algunas realizaciones, X_2 es metileno. En algunas realizaciones, X_2 es oxígeno. En algunas realizaciones, X_2 es azufre.

5 En algunas realizaciones, $m = 3$.

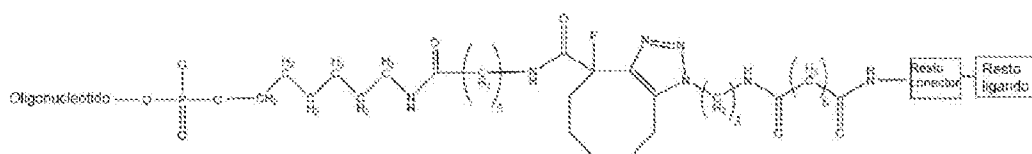
En algunas realizaciones, $n = 6$.

En algunas realizaciones, X_1 es oxígeno y X_2 es metileno. En algunas realizaciones, tanto X_1 y X_2 son metileno.

En algunas realizaciones, $q = 1$, $r = 2$, $s = 1$, $t = 1$, $v = 1$. En algunas realizaciones, $q = 1$, $r = 3$, $s = 1$, $t = 1$, $v = 1$.

10 En algunas realizaciones, R_1 es hidrógeno en cada aparición, $n = 6$, $m = 3$, R_2 es flúor, X_2 es metileno, $v = 1$, $t = 1$, $s = 1$, X_1 es metileno, $q = 1$ y $r = 2$.

Por tanto, en algunas realizaciones, los compuestos ejemplares de la invención comprenden la siguiente estructura:

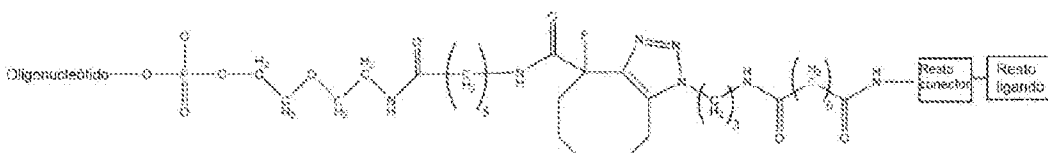


Fórmula (IV)

en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1.

15 En algunas realizaciones, R_1 es hidrógeno en cada aparición, $n = 6$, $m = 3$, R_2 es flúor, X_2 es metileno, $v = 1$, $t = 1$, $s = 1$, X_1 es oxígeno, $q = 1$ y $r = 2$.

Por tanto, en algunas realizaciones, los compuestos ejemplares de la invención comprenden la siguiente estructura:



Fórmula (II)

en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1.

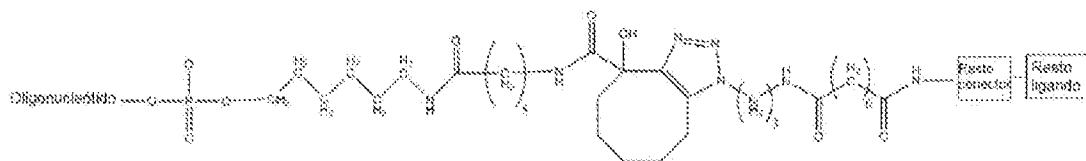
2.1.1 Restos de unión alternativos

20 Durante la síntesis de compuestos de la presente invención, pueden surgir estructuras alternativas de restos de unión. En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, los restos de unión alternativos tienen un cambio de uno o más átomos en el resto de unión del conector general en comparación con los restos de unión descritos en cualquier lugar de la presente memoria.

25 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el resto de unión alternativo es un compuesto de Fórmula (I) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, en donde R_2 es hidroxí.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, R_1 es hidrógeno en cada aparición, $n = 6$, $m = 3$, R_2 es hidroxí, X_2 es metileno, $v = 1$, $t = 1$, $s = 1$, X_1 es metileno, $q = 1$ y $r = 2$.

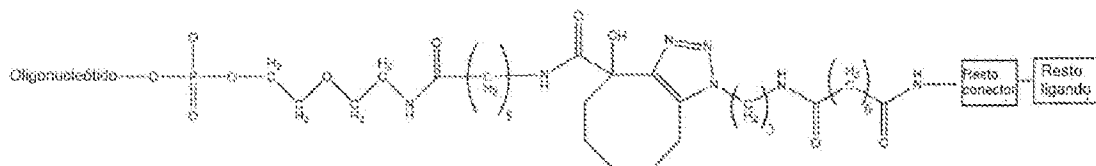
Por tanto, en algunas realizaciones descritas en la presente memoria, los compuestos de la descripción comprenden la siguiente estructura:



Fórmula (V)

- 5 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, R₁ es hidrógeno en cada aparición, n = 6, m = 3, R₂ es hidroxilo, X₂ es metileno, v = 1, t = 1, s = 1, X₁ es oxígeno, q = 1 y r = 2.

Por tanto, en algunas realizaciones descritas en la presente memoria, los compuestos de la descripción comprenden la siguiente estructura:

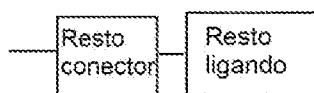


Fórmula (III)

2.2 Resto conector

- 10 En relación con la Fórmula (I), el "resto conector" como se representa en la Fórmula (I) comprende el grupo de átomos ubicado entre el resto de unión como se describe en cualquier lugar de la presente memoria y el resto de ligando como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

En la presente invención:

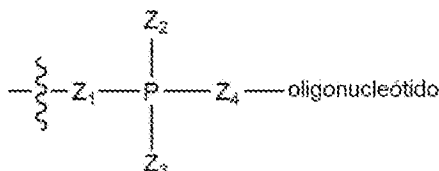


- 15 como se representa en la Fórmula (I) está según la estructura mostrada en la reivindicación 1. Realizaciones específicas de la misma se muestran en las reivindicaciones dependientes posteriores.

3. Resto oligonucleótido

Los compuestos de la presente invención comprenden un resto oligonucleótido, representado como 'Z' en la Fórmula (I) como se define en la reivindicación 1.

- 20 En la presente invención, Z es:



en donde:

Z₁, Z₂, Z₃, Z₄ son independientemente en cada aparición oxígeno o azufre; y

uno de los enlaces entre P y Z₂, y P y Z₃ es un enlace simple y el otro enlace es un enlace doble.

En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un compuesto de ARN capaz de modular la expresión de un gen objetivo. En algunas realizaciones, el oligonucleótido es un compuesto de ARN capaz de inhibir la expresión de un gen objetivo.

- 5 En algunas realizaciones, el compuesto de ARN comprende un dúplex de ARN que comprende las hebras primera y segunda, en donde la primera hebra es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ARN de un gen objetivo, y la segunda hebra es al menos parcialmente complementaria a dicha primera hebra, y en donde cada una de las hebras primera y segunda tiene extremos 5' y 3'.

- 10 En algunas realizaciones, la primera hebra es al menos 80 % complementaria a una secuencia de ARN de un gen objetivo, tal como al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 99 % complementaria, tal como 100 % complementaria sobre la longitud de la primera hebra.

En algunas realizaciones, el compuesto de ARN está unido al extremo 5' de su segunda hebra al fosfato adyacente.

En algunas realizaciones, el compuesto de ARN está unido al extremo 3' de su segunda hebra al fosfato adyacente.

- 15 Se entenderá que cuando el compuesto de ARN está unido al extremo 5' de la segunda cadena, el grupo fosfato que conecta el oligonucleótido al resto conector (es decir, la 'P' conectada a Z₁, Z₂, Z₃ y Z₄) es el grupo fosfato que existe de manera natural a partir de la ribosa terminal 5' del oligonucleótido.

Se entenderá que cuando el compuesto de ARN está unido en el extremo 3' de la segunda hebra, el grupo fosfato que conecta el oligonucleótido al resto conector (es decir, la 'P' conectada a Z₁, Z₂, Z₃ y Z₄) está diseñado en la ribosa terminal 3' del oligonucleótido, para sustituir el grupo hidroxilo que existe de manera natural en la posición 3'.

- 20 En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende un dúplex de ARN que comprende además una o más ribosas modificadas en la posición 2'. En algunas realizaciones, el dúplex de ARN comprende una pluralidad de ribosas modificadas en la posición 2'. En algunas realizaciones, las modificaciones se seleccionan de 2'-O-metilo, 2'-desoxi-fluoro y 2'-desoxi.

- 25 En algunas realizaciones, el oligonucleótido comprende además uno o más restos protectores de la degradación en uno o más extremos. En algunas realizaciones, dichos uno o más restos protectores de la degradación no están presentes en el extremo de la hebra de oligonucleótido que porta los restos ligando. En algunas realizaciones, dichos uno o más restos protectores de la degradación no están presentes en el extremo de la hebra de oligonucleótido que es adyacente al resto del compuesto como se muestra en la Fórmula (I), (VII), (IX), (X) o (XI). En algunas realizaciones, dichos uno o más restos protectores de la degradación se seleccionan de enlaces internucleotídicos fosforotioato, enlaces internucleotídicos fosforoditioato y nucleótidos abásicos invertidos, en donde dichos nucleótidos abásicos invertidos están presentes en el extremo distal de la hebra que porta los restos ligando.
- 30

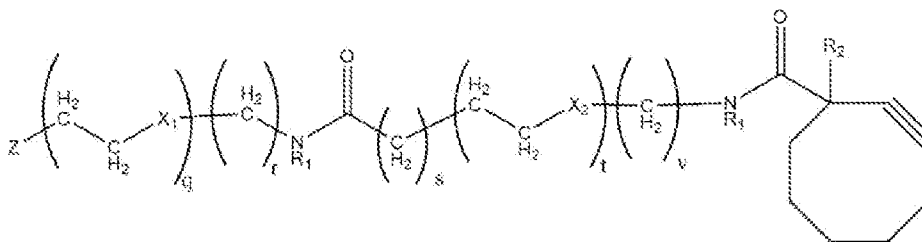
4. Compuestos ejemplares

Los compuestos de la invención son como se definen en las reivindicaciones.

4.1 Compuestos Intermedios

- 35 Los compuestos de la descripción también incluyen compuestos intermedios producidos o usados durante los procesos de producción de la descripción como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la producción de compuestos como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

Por tanto, en algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XII):



Fórmula (XII)

en donde:

R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

R₂ es F;

X₁ y X₂ en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

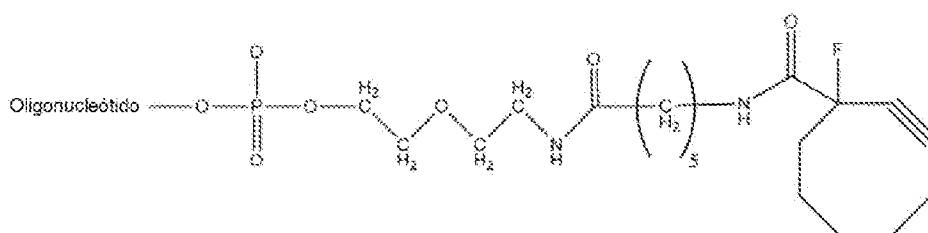
5 q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

(ii) s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

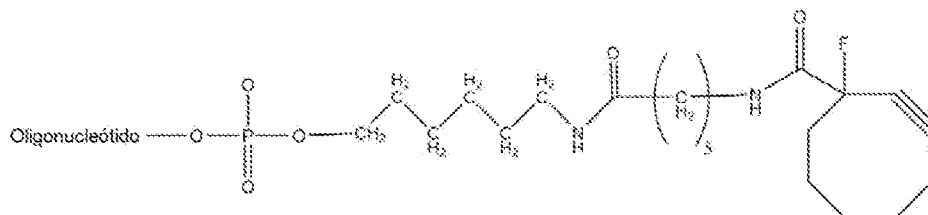
Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XIla):



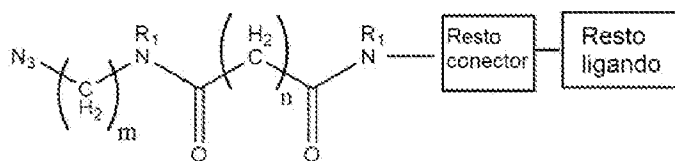
Fórmula (XIla)

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XIlc):



Fórmula (XIlc)

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XIII):



Fórmula (XIII)

en donde:

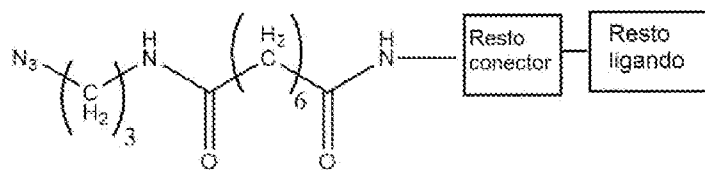
R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

m es un número entero de 1 a 6;

n es un número entero de 1 a 10; y

El resto conector y el resto ligando también son como se definen en la reivindicación 1.

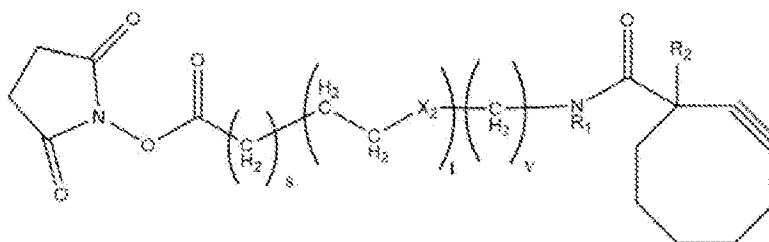
En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XIIIa):



Fórmula (XIIIa)

en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1 y reivindicaciones posteriores.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XIV):



Fórmula (XIV)

5

en donde:

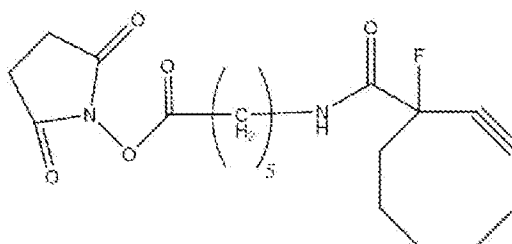
R₁ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

R₂ es F;

X₂ se selecciona del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

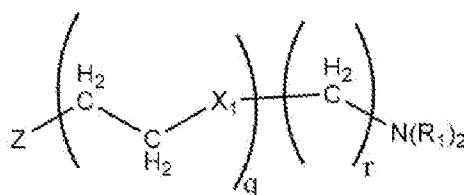
10 s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XIVa):



Fórmula (XIVa)

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XV):



Fórmula (XV)

15

en donde:

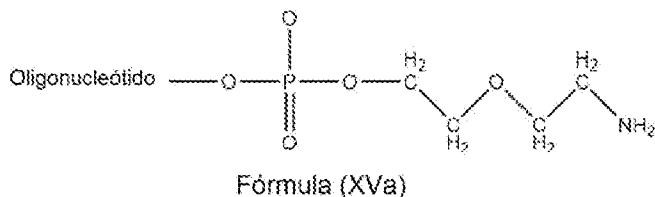
R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

X₁ se selecciona del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

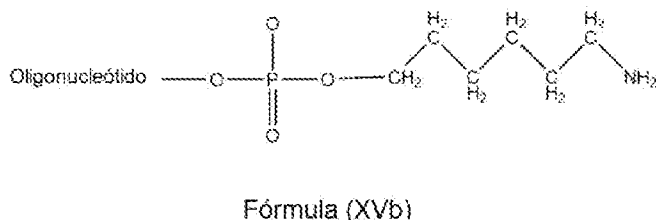
5 q y r son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo;

Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XVa):



En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto comprende la Fórmula (XVb):



5. Composiciones

La descripción se refiere a composiciones que comprenden una combinación de compuestos de la invención.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la combinación comprende un compuesto que comprende una porción de resto alternativo como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

15 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto en la composición que comprende el resto de unión alternativo como se describe en cualquier lugar de la presente memoria está presente en una cantidad del 10 % en peso o menos de dicha composición.

20 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto en la composición que comprende el resto de unión alternativo como se describe en cualquier lugar de la presente memoria está presente en una cantidad en el intervalo del 10 al 15 % en peso de dicha composición.

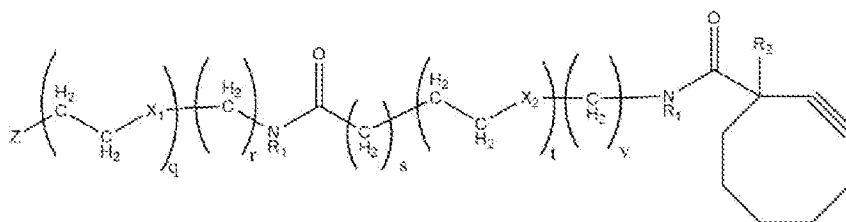
25 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la composición comprende un compuesto de Fórmula (IV) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y un compuesto de Fórmula (V) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (V) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria está presente en una cantidad en el intervalo del 10 al 15 % en peso de dicha composición.

30 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, la composición comprende un compuesto de Fórmula (II) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, y un compuesto de Fórmula (III) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria. En algunas realizaciones, el compuesto de Fórmula (III) como se describe en cualquier lugar de la presente memoria está presente en una cantidad en el intervalo del 10 al 15 % en peso de dicha composición.

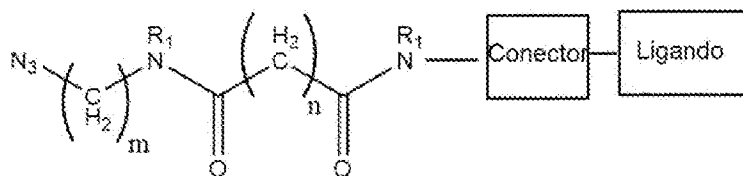
6. Proceso de producción

La descripción proporciona además un proceso para preparar un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria. La descripción proporciona además un proceso para preparar una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el proceso comprende hacer reaccionar compuestos de Fórmulas (XII) y (XIII):



Fórmula (XII)



Fórmula (XIII)

5 en donde:

R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

R₂ es F;

X₁ y X₂ en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

m es un número entero de 1 a 6;

10 n es un número entero de 1 a 10;

q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

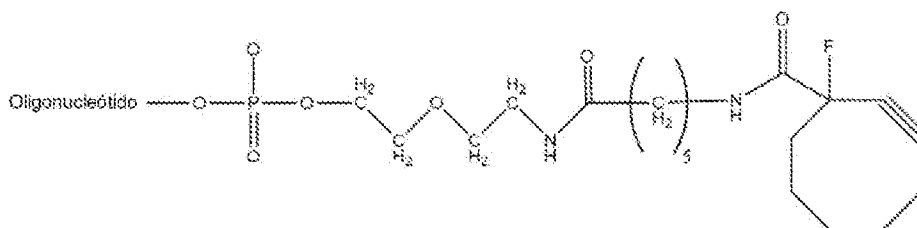
(ii) s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1;

15 en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1;

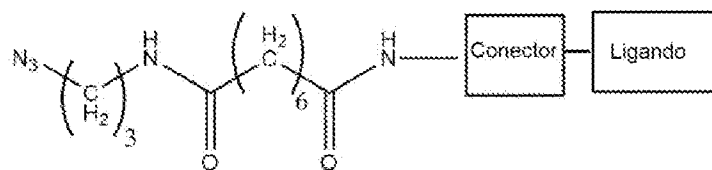
y cuando sea apropiado llevar a cabo la desprotección del ligando y/o la hibridación de una segunda hebra para el resto oligonucleótido.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto de Fórmula (XII) es Fórmula (XIIa):



Fórmula (XIIa)

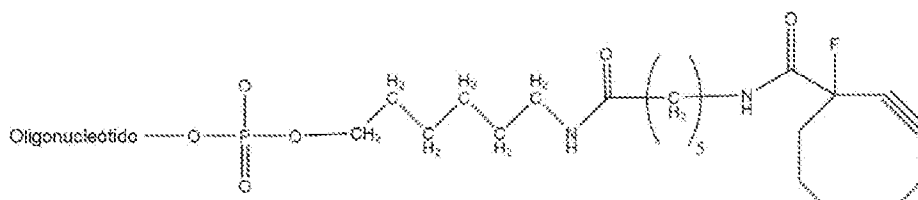
y el compuesto de Fórmula (XIII) es Fórmula (XIIIa):



Fórmula (XIIIa)

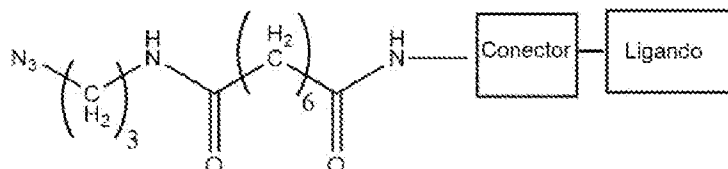
- 5 en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1 y el oligonucleótido comprende un dúplex de ARN que comprende hebras primera y segunda, en donde la primera hebra es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ARN de un gen objetivo, y la segunda hebra es al menos parcialmente complementaria a dicha primera hebra, y en donde cada una de las hebras primera y segunda tiene extremos 5' y 3', y en donde dicho dúplex de ARN está unido en el extremo 5' de su segunda hebra al fosfato adyacente.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto de Fórmula (XII) es Fórmula (XIIc):



Fórmula (XIIc)

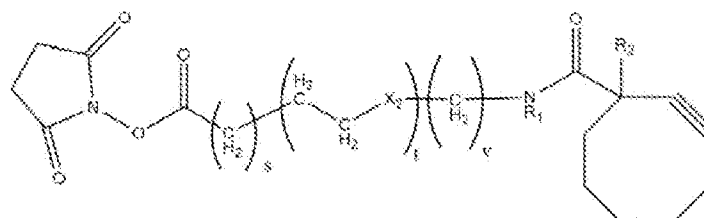
- 10 y el compuesto de Fórmula (XIII) es Fórmula (XIIIa):



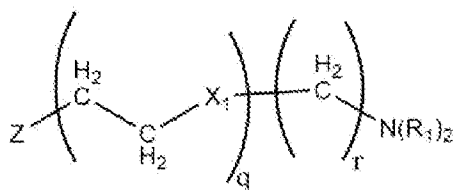
Fórmula (XIIIa)

- 15 en donde el resto conector y el resto ligando son como se definen en la reivindicación 1 y el oligonucleótido comprende un dúplex de ARN que comprende hebras primera y segunda, en donde la primera hebra es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ARN de un gen objetivo, y la segunda hebra es al menos parcialmente complementaria a dicha primera hebra, y en donde cada una de las hebras primera y segunda tiene extremos 5' y 3', y en donde dicho dúplex de ARN está unido en el extremo 3' de su segunda hebra al fosfato adyacente.

En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, un compuesto de Fórmula (XII) se prepara haciendo reaccionar compuestos de Fórmulas (XIV) y (XV):



Fórmula (XIV)



Fórmula (XV)

R₁ en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;

R₂ es F;

X₁ y X₂ en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;

5 q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

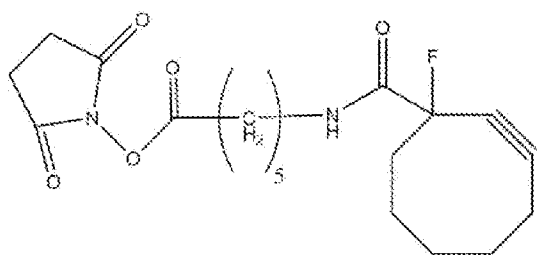
(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

(ii) s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

Z es un resto oligonucleótido como se define en la reivindicación 1.

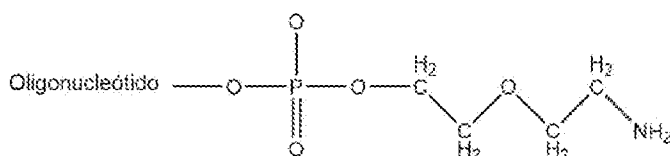
En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el compuesto de Fórmula (XIV) es Fórmula (XIVa):

10

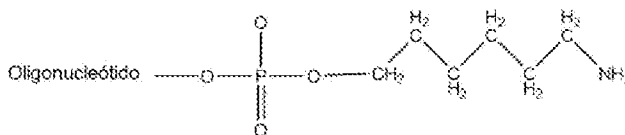


Fórmula (XIVa)

y el compuesto de Fórmula (XV) es la Fórmula (XVa) o la Fórmula (XIVb):



Fórmula (XVa)



Fórmula (XIVb)

15 en donde el oligonucleótido comprende un dúplex de ARN que comprende hebras primera y segunda, en donde la primera hebra es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ARN de un gen objetivo, y la segunda hebra es al menos parcialmente complementaria a dicha primera hebra, y en donde cada una de las hebras primera y segunda tienen extremos 5' y 3', y en donde (i) dicho dúplex de ARN está unido en el extremo 5' de su segunda hebra al fosfato adyacente en la Fórmula (XVa), o (ii) dicho dúplex de ARN está unido en el extremo 3' de su segunda hebra al fosfato adyacente en la Fórmula (XIVb).

20

7. Usos

La descripción se refiere al uso de los compuestos y composiciones como se describen en cualquier lugar de la presente memoria.

- 5 La presente descripción también se refiere a los usos de un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de otro compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

La presente descripción se refiere además a los usos de una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para la preparación de otra composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

- 10 En algunas realizaciones descritas en la presente memoria, el uso es para la preparación de un compuesto o una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, en donde $R_2 = F$.

La descripción se refiere a un compuesto o composición obtenido, o que puede obtenerse mediante un proceso como se describe en cualquier lugar de la presente memoria.

- 15 La invención se refiere a usos terapéuticos de los compuestos y composiciones descritos en cualquier lugar de la presente memoria.

- 20 Por lo tanto, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

La presente descripción también se refiere a un compuesto como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para uso en terapia. La presente invención también se refiere a una composición como se describe en cualquier lugar de la presente memoria, para uso en terapia.

- 25 La presente invención también abarca dosis, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos y formulaciones de profármacos adecuadas.

Los compuestos de la invención se pueden usar como reactivos de investigación para, por ejemplo, diagnóstico, terapéutica y profilaxis.

- 30 En terapia, los compuestos de la invención se pueden usar para modular específicamente la síntesis de una proteína objetivo en una célula. Esto se puede lograr degradando, silenciando o inhibiendo el ARNm de dicha proteína objetivo, evitando así la formación de dicha proteína. Alternativamente, los compuestos de la invención se pueden usar para modular una molécula de ADN o ARN no codificante que ejerce un efecto regulador sobre los mecanismos dentro de una célula en células y animales de experimentación, facilitando así el análisis funcional del objetivo o una evaluación de su utilidad como objetivo para la intervención terapéutica.

- 35 En realizaciones preferidas, la proteína objetivo está en una célula objetivo que comprende receptores de asialoglicoproteína (ASPGR) en la superficie, tales como células hepáticas, en particular hepatocitos.

Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse como terapia para su uso en un animal o un ser humano, sospechoso de tener una enfermedad o trastorno, que puede aliviarse o tratarse modulando un ADN o ARN que codifica un polipéptido objetivo de mamífero en dicho animal o humano.

En realizaciones preferidas, el ácido nucleico objetivo es un gen, un ARN mensajero (ARNm) o un microARN (miARN).

- 40 Además se proporcionan como parte de la descripción y no parte de la invención métodos para tratar a un mamífero, tal como tratar a un ser humano, sospechoso de tener o ser propenso a una enfermedad o condición, mediante la administración de una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de uno o más de los compuestos o composiciones de la invención.

- 45 La descripción también proporciona el uso del compuesto o conjugado de la invención como se describe para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o para un método de tratamiento de un trastorno afectado por la modulación de un ácido nucleico objetivo.

La descripción también proporciona un método para tratar un trastorno, comprendiendo dicho método administrar un compuesto según la invención y/o una composición farmacéutica según la invención a un paciente que lo necesite.

- 50 Ejemplos de trastornos a tratar son enfermedades hepáticas tales como hepatitis (incluidas las hepatitis virales, como VHB o VHC), esteatosis hepática, aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, p. ej. ganancia de mutaciones de función en la apolipoproteína B, desequilibrio del colesterol HDL/LDL, dislipidemias,

por ejemplo, hiperlipidemia familiar (FCHL), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a estatinas, enfermedad de las arterias coronarias (CAD) y enfermedad coronaria (CHD), cirrosis y cáncer.

8. Definiciones

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos, notaciones y otros términos o terminología técnica y científica usados en la presente memoria pretenden tener el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece el tema reivindicado. En algunos casos, los términos con significados comúnmente entendidos se definen en la presente memoria por claridad y/o para una fácil referencia, y la inclusión de dichas definiciones en la presente memoria no necesariamente debe interpretarse como que representa una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la técnica.
- 10 Debe entenderse que esta invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante. Como se usa en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referentes en plural a menos que el contenido indique claramente lo contrario.
- 15 El término "aproximadamente", como se usa en la presente memoria, se refiere al intervalo de error habitual para el valor respectivo fácilmente conocido por el experto en este campo técnico. La referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en la presente memoria incluye (y describe) realizaciones que están dirigidas a ese valor o parámetro per se.
- 20 Se entiende que los aspectos y realizaciones de la invención descrita en la presente memoria incluyen "que comprenden", "que consisten" y "que consisten esencialmente en" aspectos y realizaciones.
- Como se usa en la presente memoria, el término "y/o" se refiere a cualquiera de los elementos, cualquier combinación de los elementos o todos los elementos con los que está asociado el término. Por ejemplo, la frase "A, B y/o C" pretende abarcar cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o B; A o C; B o C; A y B; A y C; B y C; A y B o C; B y A o C; C y A o B; A (solo); B (solo); y C (solo).

25 9. Ejemplos

La invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

En los ejemplos se usan los siguientes constructos:

Tabla 1:

Objetivo	ID	Secuencia sentido 5' → 3'	Secuencia antisentido 5' → 3'
hsHAO1	ETX003	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa
hsHAO1	ETX005	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfcCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usAfsuauUfuCfcfaggaUfgAfaagucscsa
hsHAO1	ETX001	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfcCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	usAfsuauUfuCfcfaggaUfgAfaagucscsa
hsHAO1	ETX007	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(MFCCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa
hsC5	ETX014	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfaa(NHC6)(MFCCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usAfsUfuAfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcuusudTdT
hsC5	ETX010	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuAfaAfaa(invabasic)(invabasic)	usAfsUfuAfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcuusudTdT
hsC5	ETX012	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaAfsusAf	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT
hsC5	ETX012 (FLP puro)	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaAfsusAf	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT
hsC5	ETX012 (puro - 2Da)	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaAfsusAf	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT

Objetivo	ID	Secuencia sentido 5' → 3'	Secuencia antisentido 5' → 3'
hsC5	ETX016	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHCC6)(MFCCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT
hsTTR	ETX019	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasga(invabasic)(invabasic)	usCfsuugGfuUAfcaugAfaAfucccasusc
hsTTR	ETX021	(ET-GalNAc-T1N3)(MFCCO)(NH-DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGsAf	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc
hsTTR	ETX023	(invabasic)(invabasic)usgggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHCC6)(MFCCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usCfsuugGfuUAfcaugAfaAfucccasusc
hsTTR	ETX025	UfsGsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHCC6)(MFCCO)(ET-GalNAc-T1N3)	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc

En la Tabla 1, los componentes entre paréntesis que tienen la siguiente nomenclatura (ET-GaINAc-T1N3), (MFCO) y (NH-DEG) son descriptores de elementos de los conectores, y las estructuras conectoras correspondientes completas se muestran en la Fig. 20 y la Fig. 21 de la presente memoria. Esta correspondencia de abreviatura con la estructura conectora real se aplica de manera similar a todas las demás referencias de las abreviaturas anteriores en la presente memoria.

La referencia a (invabasic)(invabasic) se refiere a nucleótidos en un polinucleótido general que son los 2 nucleótidos terminales que tienen restos azúcar que son (i) abásicos y (ii) en una configuración invertida, por lo que el enlace entre el penúltimo nucleótido y el antepenúltimo nucleótido tiene un enlace inverso, concretamente un enlace 5-5 o 3-3. Nuevamente, esto se aplica de manera similar a todas las demás referencias a (invabasic)(invabasic) en la presente memoria.

Tabla 1A

Objetivo	ID	Descriptor corto	Conector más ligando ARNip como en la tabla 1
hsHAO1	ETX003	5'-GaINAc T1b alterno	Conector + ligando como en la Figura 21
hsHAO1	ETX005	3'-GaINAc T1a abásico invertido	Conector + ligando como en la Figura 20
hsHAO1	ETX001	5'-GaINAc T1b abásico invertido	Conector + ligando como en la Figura 21
hsHAO1	ETX007	3'-GaINAc T1a alterno	Conector + ligando como en la Figura 20
hsC5	ETX014	3'-GaINAc T1a abásico invertido	Conector + ligando como en la Figura 20
hsC5	ETX010	5'-GaINAc T1b abásico invertido	Conector + ligando como en la Figura 21
hsC5	ETX012	5'-GaINAc T1b alterno	Conector + ligando como en la Figura 21
hsC5	ETX012 (FLP puro)	5'-GaINAc T1b alterno	Conector + ligando como en la Figura 21
hsC5	ETX012 (puro - 2Da)	5'-GaINAc T1b alterno	Conector + ligando como en la Figura 21
hsC5	ETX016	3'-GaINAc T1a alterno	Conector + ligando como en la Figura 20
hsTTR	ETX019	5'-GaINAc T1b abásico invertido	Conector + ligando como en la Figura 21
hsTTR	ETX021	5'-GaINAc T1b alterno	Conector + ligando como en la Figura 21
hsTTR	ETX023	3'-GaINAc T1a abásico invertido	Conector + ligando como en la Figura 20
hsTTR	ETX025	3'-GaINAc T1a alterno	Conector + ligando como en la Figura 20

También debe entenderse, como ya se explicó en la presente memoria con referencia a la FIG 20/FIG 21, que cuando sea apropiado para las porciones de conector como se muestra en la FIG 20/FIG 21 que pueden estar presentes en cualquiera de los productos ETX001, ETX003, ETX005, ETX007, ETX010, ETX012, ETX014, ETX016, ETX019, ETX021, ETX023 y ETX025 según la presente invención, que si bien estos productos pueden incluir moléculas basadas en las porciones de conector y ligando como se representa específicamente en la FIG 20/FIG 21 unidas a un resto oligonucleótido como también se representa en la presente memoria, estos productos pueden comprender además alternativamente, o consistir esencialmente en, moléculas en donde las porciones de conector y ligando están esencialmente como se representan en la FIG 20/FIG 21 unidas a un resto oligonucleótido pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG 20/FIG 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que se produce como resultado del desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH. De esta manera, (a) estos

- 5 productos pueden consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando específicamente como se representa en la Figura 20/Figura 21, con un sustituyente F en el anillo ciclooctilo; o (b) estos productos pueden consistir esencialmente en moléculas que tienen porciones de conector y ligando esencialmente como se representa en la FIG 20/FIG 21 pero que tienen el sustituyente F como se muestra en la FIG 20/FIG 21 en el anillo ciclooctilo sustituido por un sustituyente que ocurre como resultado de un desplazamiento hidrolítico, tal como un sustituyente OH, o (c) estos productos pueden comprender una mezcla de moléculas como se define en (a) o (b).

En los ejemplos también se usan los siguientes constructos de control:

Tabla 2:

Objetivo	ID	Secuencia sentido 5' → 3'	Secuencia antisentido 5' → 3'
F-Luc	XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAdTsdT	UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT
hsFVII	XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGGAdTsdT	UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT
hsAHSa1	XD-15421	uscsUfcGfuGfgCfcUfuAfaUfgAfaAf(invdT)	UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfasusu

10 Abreviaturas:

AHSA1 Activador de la proteína de choque térmico ATPasa1

ASGR1 Receptor 1 de asialoglicoproteína

ASO Oligonucleótido antisentido

ADNb ADN ramificado

15 pb Par de bases

C5 complemento C5

conc. concentración

ctrl. control

CV coeficiente de variación

20 dG, dC, dA, Dt residuos de ADN

F flúor

FCS suero de ternera fetal

GalNAc N-acetilgalactosamina

GAPDH Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa

25 G, C, A, U residuos de ARN

g, c, a, u Residuos modificados con 2'-O-metilo

Gf, Cf, Af, Uf Residuos modificados con 2'-fluoro

h hora

HAO1 Hidroxiácido oxidasa 1

30 HPLC Cromatografía líquida de alta resolución

Hs Homo sapiens

IC50 concentración de un inhibidor donde la respuesta se reduce en un 50 %

ID identificador

KD bloqueo

	LF2000	lipofectamina2000
	M	molar
	Mf	Macaca fascicular
	min	minuto
5	VM	valor medio
	n.a o N/A	no aplicable
	NEAA	aminoácido no esencial
	nt	nucleótido
	QC	Control de calidad
10	QG2.0	QuantiGene 2.0
	RLU	unidad de luz relativa
	ARNi	ARN de interferencia
	TA	temperatura ambiente
	s	Modificación del esqueleto de fosforotioato
15	SAR	relación estructura-actividad
	DE	Desviación Estándar
	ARNip	ARN pequeño de interferencia
	TTR	transtiretina

9.1 Ejemplo 1

20 - Resumen

Se sintetizaron y sometieron a control de calidad los GalNAc-ARNip dirigidos a ARNm de hsHAO1, hsC5 o hsTTR. El conjunto completo de ARNip (excepto los ARNip dirigidos a HAO1) se estudió primero en una configuración de respuesta a la dosis en células HepG2 mediante transfección utilizando RNAiMAX, seguido de un análisis de respuesta a la dosis en un entorno gimnótico de absorción libre en hepatocitos humanos primarios.

25 La incubación directa de hepatocitos humanos primarios con GalNAc-ARNip dirigidos a ARNm de hsHAO1, hsC5 o hsTTR dio como resultado un silenciamiento del ARNm en el objetivo dependiente de la dosis en diversos grados.

- Objetivo del estudio

El objetivo de este conjunto de experimentos fue analizar la actividad in vitro de diferentes GalNAc-ligandos en el contexto de ARNip dirigidos a tres objetivos diferentes, concretamente ARNm de hsHAO1, hsC5 o hsTTR.

30 Los paquetes de trabajo de este estudio incluyeron (i) desarrollo de ensayos para diseñar, sintetizar y probar conjuntos de sondas de ADNb específicos para todos y cada uno de los objetivos individuales de interés, (ii) identificar una línea celular adecuada para experimentos de detección posteriores, (iii) análisis de respuesta a la dosis de potencialmente todos los ARNip (mediante transfección) en una o más líneas celulares de cáncer humano, y (iv) análisis de respuesta a la dosis de ARNip en hepatocitos humanos primarios en un entorno gimnótico de absorción libre. En ambos entornos, se deben calcular los valores de IC50 y los valores de inhibición máxima, seguidos de la clasificación del conjunto de estudio de ARNip según su potencia.

- Material y métodos

Síntesis de oligonucleótidos

40 Se usaron métodos estándar de síntesis en fase sólida para sintetizar químicamente los ARNip de interés (véase la Tabla 1), así como controles (véase la Tabla 2).

Experimentos de cultivo celular y transfección in vitro

El cultivo celular, la transfección y el ensayo de ADN ramificado QuantiGene2.0 se describen a continuación, y las secuencias de ARNip se enumeran en las Tablas 1 y 2. Las células HepG2 fueron suministradas por la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) (HB-8065, lote n°: 63176294) y se cultivaron en medio esencial mínimo Eagle formulado por la ATCC suplementado para contener un 10 % de suero fetal de ternera (FCS). Los hepatocitos humanos primarios (PHH) se obtuvieron de Primacyt (Schwerin, Alemania) (n° de lote: CyHuf19009HEC). Las células se derivan de un tumor de glioblastoma maligno mediante técnica de explante. Todas las células utilizadas en este estudio se cultivaron a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO₂ en una incubadora humidificada.

Para la transfección de células HepG2 con ARNip dirigidos a hsc5 o hstTR (y controles), se sembraron células a una densidad de 20.000 células/pocillo en placas normales de cultivo de tejidos de 96 pocillos. La transfección de células con ARNip se llevó a cabo usando el reactivo de transfección RNAiMAX disponible comercialmente (Invitrogen/Life Technologies) según las instrucciones del fabricante. Se realizaron experimentos de respuesta a la dosis de 10 puntos de 20 candidatos (11x hsc5, 9x hstTR) en células HepG2 con concentraciones finales de ARNip de 24, 6, 1,5, 0,4, 0,1, 0,03, 0,008, 0,002, 0,0005 y 0,0001 nM, respectivamente.

El análisis de respuesta a la dosis en PHH se realizó mediante incubación directa de células en un entorno gimnótico de absorción libre, comenzando con una concentración final de ARNip más alta de 1,5 µM, seguida de 500 nM y desde allí descendiendo en serie en etapas de dilución doble.

Los pocillos de control se transfectaron en células HepG2 o se incubaron directamente con hepatocitos humanos primarios a las concentraciones de ARNip de prueba más altas estudiadas en la placa correspondiente. Todos los ARNip de control incluidos en las diferentes fases del proyecto junto al tratamiento simulado de células se resumen y enumeran en la Tabla 2. Para cada ARNip y control, se transfectaron/incubaron directamente al menos cuatro pocillos en paralelo, y se recogieron puntos de datos individuales de cada pocillo.

Después de 24 h de incubación con ARNip posterior a la transfección, se eliminó el medio y las células HepG2 se lisaron en una mezcla de lisis (1 volumen de tampón de lisis más 2 volúmenes de agua libre de nucleasas) y luego se incubaron a 53 °C durante al menos 45 minutos. En el caso de los PHH, el medio de cultivo se eliminó 5 h después del tratamiento de las células, seguido de la adición de 50 µl de medio de mantenimiento completo por pocillo. Los medios se intercambiaron de esa manera cada 24 h hasta un período de incubación total de 72 h. En el punto temporal de 4 o 72 h, se eliminó el sobrenadante del cultivo celular seguido de la adición de 200 µl de mezcla de lisis suplementada con 1:1000 en v/v de proteinasa K.

El ensayo de ADN ramificado (ADNb) se realizó según las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se leyó utilizando un contador de luminiscencia 1420 (WALLAC VICTOR Light, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Alemania) después de 30 minutos de incubación en presencia de sustrato en la oscuridad. Para cada pocillo, los niveles de ARNm objetivo se normalizaron a los niveles de ARNm de hsgAPDH. La actividad de cualquier ARNip se expresó como porcentaje de concentración de ARNm objetivo (normalizada a ARNm de hsgAPDH) en las células tratadas, en relación con la concentración media de ARNm objetivo (normalizada a ARNm de hsgAPDH) en los pocillos de control.

Desarrollo de ensayos

Se diseñaron y sintetizaron conjuntos de sondas de ADN ramificado (ADNb) QuantiGene2.0 específicos para GAPDH, AhsA1, hshA01, hsc5 y hstTR de Homo sapiens. Los conjuntos de sondas de ADNb se probaron inicialmente mediante análisis de ADNb según las instrucciones del fabricante, con evaluación de los niveles de ARNm de interés en dos cantidades diferentes de lisado, concretamente 10 µl y 50 µl, de las siguientes líneas celulares de cáncer humano y de mono junto a hepatocitos humanos primarios: SJSA-1, TF1, NCI-H1650, Y-79, Kasumi-1, EAhy926, Caki-1, Colo205, RPTC, A253, HeLaS3, Hep3B, BxPC3, DU145, THP-1, NCI-H460, IGR37, LS174T, Be(2)-C, SW 1573, NCI-H358, TC71, 22Rv1, BT474, HeLa, KBwt, Panc-1, U87MG, A172, C42, HepG2, LNCaP, PC3, Supt11, A549, HCT116, HuH7, MCF7, SH- SY5Y, HUVEC, C33A, HEK293, HT29, MOLM 13 y SK-MEL-2. Se usaron pocillos que contenían únicamente un conjunto de sondas de ADNb sin la adición de lisado celular para monitorizar el fondo técnico y la señal de ruido.

- Resultados

Identificación de tipos de células adecuados para la detección de GalNAc-ARNip

Las Fig. 1 a Fig. 3 muestran datos de expresión de ARNm para los tres objetivos de interés, concretamente hsc5, hshA01 y hstTR, en lisados de un conjunto diverso de líneas celulares de cáncer humano más hepatocitos humanos primarios. Los números de células por volumen de lisado son idénticos con cada línea celular analizada; esto es necesario para permitir comparaciones de niveles de expresión entre diferentes tipos de células. La Fig. 1 muestra datos de expresión de ARNm de hsc5 para todos los tipos de células analizadas.

También se analizó la expresión de ARNm de hshA01 en tipos idénticos de células; los resultados se muestran en diagramas de barras como parte de la Fig. 2.

Por último, se identificaron tipos de células adecuados que permitirían la detección de GalNAc-ARNip dirigidos a hsTTR; los datos respectivos forman parte de la Fig. 3.

En resumen, los niveles de expresión de ARNm para los tres objetivos de interés son suficientemente altos en los hepatocitos humanos primarios (PHH). Además, las células HepG2 podrían usarse para detectar GalNAc-ARNip dirigidos a ARNm de hsC5 y hsTTR; por el contrario, no se pudo identificar ninguna línea celular cancerosa que fuera adecuada para probar ARNip específicos para el ARNm de hshAO1.

Análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hsTTR en células HepG2

Después de la optimización de la transfección, las células HepG2 se transfectaron con el conjunto completo de GalNAc-ARNip dirigidos a hsTTR (véase la Tabla 1) en una configuración de respuesta a la dosis usando RNAiMAX. La concentración final más alta de la prueba de ARNip fue de 24 nM, y se redujo en nueve etapas de dilución cuádruple. El experimento finalizó a las 4 h y 24 h después de la transfección de células HepG2. La Tabla 3 enumera los datos de actividad de todos los GalNAc-ARNip dirigidos a hsTTR estudiados.

Tabla 3: Objetivo, tiempo de incubación, ID externa, Valores de IC20/IC50/ IC80 e inhibición máxima de ARNip dirigido a hsTTR en células HepG2. La lista está ordenada según la ID externa, con 4 h de incubación en la parte superior y 24 h de incubación en la parte inferior.

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
hsTTR	4	ETX019	0,206	3,769	nº N/A	58,4
hsTTR	4	ETX021	nº N/A	nº N/A	nº N/A	3,2
hsTTR	4	ETX023	1,338	nº N/A	nº N/A	45,9
hsTTR	4	ETX025	nº N/A	nº N/A	nº N/A	-1,8
hsTTR	24	ETX019	0,002	0,016	0,143	96,0
hsTTR	24	ETX021	0,014	0,053	0,236	94,4
hsTTR	24	ETX023	0,005	0,019	0,081	96,2
hsTTR	24	ETX025	0,018	0,075	0,392	92,9

Los resultados de la incubación de 24 h también se muestran en las Figuras 4A-D.

En general, la transfección de células HepG2 con ARNip dirigido a hsTTR da como resultado un silenciamiento de ARNm objetivo que abarca en general todo el intervalo de actividad desde el 0 % de silenciamiento hasta la inhibición máxima. Los datos generados 24 h después de la transfección son más sólidos con variaciones estándar más bajas, en comparación con los datos generados solo 4 h después de la transfección. Además, el grado de bloqueo del objetivo generalmente aumenta con el tiempo desde 4 h hasta 24 h de incubación. Se han identificado GalNAc-ARNip de hsTTR que silencian el ARNm objetivo >95 % con valores de IC50 en el intervalo bajo de pM de dos dígitos.

Análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hsC5 en células HepG2

El segundo objetivo de interés, el ARNm de hsC5, se probó en una configuración de respuesta a la dosis idéntica (sin embargo, con concentraciones de prueba de ARNip finales mínimamente diferentes) mediante la transfección de células HepG2 usando RNAiMAX con GalNAc-ARNip que comparten variaciones idénticas de permanencia/posición/GalNAc-ligando como ocurre con los ARNip de hsTTR, pero con secuencias específicas para el ARNm de hsC5 objetivo. Además, en el conjunto de prueba de moléculas de estudio se incluyeron dos variantes adicionales de ARNip XD-30951. Una variante era un producto de longitud completa (FLP) menos una fracción 2Da, la otra era FLP puro fraccionado.

Tabla 4: Objetivo, tiempo de incubación, ID externa, Valores DE IC20/IC50/IC80 e inhibición máxima de ARNip dirigido a hsC5 en células HepG2. La lista está ordenada según la ID externa, con 4 h de incubación en la parte superior y 24 h de incubación en la parte inferior.

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
C5	4	ETX010	0,125	0,445	nº N/A	71,1
C5	4	ETX012	0,087	0,756	nº N/A	67,2

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
C5	4	ETX012 (variante FLP pura)	0,157	0,707	nº N/A	62,9
C5	4	ETX012 (variante pura - 2Da)	0,347	2,795	nº N/A	62,2
C5	4	ETX014	0,595	2,554	nº N/A	52,7
C5	4	ETX016	0,466	2,180	nº N/A	67,1
C5	24	ETX010	0,003	0,011	0,064	88,3
C5	24	ETX012	0,003	0,013	0,155	84,3
C5	24	ETX012 (variante FLP pura)	0,001	0,007	0,115	84,0
C5	24	ETX012 (variante pura - 2Da)	0,003	0,014	0,142	85,5
C5	24	ETX014	0,003	0,014	0,130	88,3
C5	24	ETX016	0,004	0,019	0,220	84,1

Los resultados de la incubación de 24 h también se muestran en las Figuras 5A-D

Existe un silenciamiento del ARNm de hsC5 objetivo dependiente de la dosis tras la transfección de células HepG2 con el conjunto de GalNAc-ARNip específico para hsC5. Ya se puede detectar cierta bloqueo a las 4 h después de la transfección de las células; se observa un silenciamiento aún mayor en el objetivo después de un período de incubación más largo, concretamente 24 horas. Se han identificado que GalNAc-ARNip de hsC5 silencian el ARNm objetivo en casi un 90 % con valores de IC50 en el intervalo bajo de pM de un solo dígito.

Identificación de un lote de hepatocitos humanos primario adecuado para analizar todos los GalNAc-ARNip

El análisis de respuesta a la dosis de los dos conjuntos de GalNAc-ARNip en la línea celular de cáncer humano HepG2 debería demostrar (y garantizar) que todas las nuevas variantes de GalNAc-conector/posición/caperuza son de hecho sustratos para la unión eficiente a AGO2 y la carga en RISC, y además, son capaces de funcionar en la escisión del ARNm objetivo mediada por ARNi. Sin embargo, para probar si los derivados de GalNAc-ligando de direccionamiento permiten una absorción eficiente en los hepatocitos, se deben realizar experimentos de análisis de respuesta a la dosis en hepatocitos humanos primarios mediante una configuración gimnótica de absorción libre. Los hepatocitos expresan exclusivamente el receptor de asialoglicoproteína (ASGR1) en niveles elevados, y el hígado generalmente usa este receptor para eliminar las glicoproteínas objetivo de la circulación. A estas alturas ya es de conocimiento común que ciertos tipos de oligonucleótidos, p. ej. los ARNip o ASO, conjugados con GalNAc-ligandos, son reconocidos por este receptor de alta sustitución y absorbidos eficientemente en el citoplasma a través de vesículas recubiertas de clatrina y transportados a los compartimentos endosómicos. Se cree que el escape endosómico es la etapa limitante de la velocidad de administración de oligonucleótidos.

Se realizó un experimento de desarrollo de ensayo intermedio en donde se analizaron diferentes lotes de hepatocitos humanos primarios para determinar sus niveles de expresión de genes de interés relevantes, concretamente hsC5, hsTTR, hsHAO1, hsGAPDH y hsAHS1. Primacyt (Schwerin, Alemania) proporcionó tres viales de diferentes lotes de hepatocitos humanos primarios para realizar pruebas, concretamente BHuf16087, CHF2101 y CyHuf19009. Las células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos recubiertas de colágeno, seguido de la incubación de las células durante 0 h, 24 h, 48 h y 72 h antes de la lisis celular y el análisis de ADNb para monitorizar los niveles de ARNm de interés. La Fig. 6 muestra los datos absolutos de expresión de ARNm para los tres objetivos de interés - hsTTR, hsC5 y hsHAO1 - en los lotes de hepatocitos humanos primarios BHuf16087, CHF2101 y CyHuf19009. Los niveles de expresión de ARNm de hsGAPDH y hsAHS1 se muestran en la Figura 7.

En las Figuras 6 y 7, la columna de la izquierda de cada triplete de conjuntos de datos es BHuf16087, la columna del medio es CHF2101 y la columna de la derecha es CyHuf19009.

En general, la expresión de ARNm de los tres objetivos de interés en los lotes de hepatocitos humanos primarios BHuf16087 y CyHuf19009 es lo suficientemente alta después de 72 h para continuar con el ensayo de ADNb. Debido a la cantidad total de viales disponibles para más experimentos, continuamos los experimentos con el lote CyHuf19009.

5 Análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hsHAO1 en PHH

Tras la identificación de un lote adecuado (CyHuf19009) de hepatocitos humanos primarios (PHH), se realizó un análisis gimnótico de absorción libre de GalNAc-ARNip dirigidos a hsHAO1, enumerados en la Tabla 1. La concentración final de ARNip más alta analizada fue de 1,5 μ M, seguida de 500 nM, disminuyendo en ocho etapas dobles de dilución en serie hasta la concentración final más baja de ARNip de 1,95 nM. Los experimentos finalizaron a las 4 h y 72 h después de la incubación directa de células PHH. La Tabla 5 enumera los datos de actividad de todos los GalNAc-ARNip dirigidos a hsHAO1 estudiados. Todos los ARNip de control incluidos en este experimento se resumen y enumeran en la Tabla 2.

Tabla 5: Objetivo, tiempo de incubación, ID externa, valores de IC20/IC50/IC80 e inhibición máxima de GalNAc-ARNip dirigidos a hsHAO1 en hepatocitos humanos primarios (PHH). La lista está organizada según la ID externa, con 4 h y 72 h de incubación en la parte superior e inferior, respectivamente.

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
hsHAO1 (hsGO1)	4	ETX001	nº N/A	nº N/A	nº N/A	3,5
hsHAO1 (hsGO1)	4	ETX003	nº N/A	nº N/A	nº N/A	8,4
hsHAO1 (hsGO1)	4	ETX005	nº N/A	nº N/A	nº N/A	0,7
hsHAO1 (hsGO1)	4	ETX007	nº N/A	nº N/A	nº N/A	0,2
hsHAO1 (hsGO1)	72	ETX001	7,1	514,2	nº N/A	54,3
hsHAO1 (hsGO1)	72	ETX003	1,5	53,7	nº N/A	49,3
hsHAO1 (hsGO1)	72	ETX005	1,5	127,2	nº N/A	53,8
hsHAO1 (hsGO1)	72	ETX007	4,0	nº N/A	nº N/A	38,7

Los resultados de la incubación de 72 h también se muestran en las Figuras 8A-D.

La absorción gimnótica libre de GalNAc-ARNip dirigidos a hsHAO1 no condujo a un silenciamiento significativo en el objetivo en el periodo de las 4 h; sin embargo, después de 72 h de incubación, el silenciamiento en el objetivo fue visible en un intervalo de inhibición máxima de 35,5 a 58,1 %.

Análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hsc5 en PHH

El segundo objetivo de interés, el ARNm de hsc5, se probó en una configuración de respuesta a la dosis idéntica mediante absorción gimnótica libre en PHH con GalNAc-ARNip que comparten variaciones idénticas de conector/posición/GalNAc-ligando que con hsTTR y hsHAO1 probados en los ensayos anteriores, pero con secuencias específicas para el ARNm de hsc5 objetivo. Las secuencias de los GalNAc-ARNip dirigidos a hsc5 y todas las secuencias e información sobre los ARNip de control se enumeran en la Tabla 1 y la Tabla 2, respectivamente. El experimento finalizó después de 4 h y 72 h de incubación directa de PHH. La Tabla 6 enumera los datos de actividad de todos los GalNAc-ARNip dirigidos a hsc5 estudiados.

Tabla 6: Objetivo, tiempo de incubación, ID externa, valores de IC20/IC50/IC80 e inhibición máxima de GalNAc-ARNip dirigidos a hsc5 en PHH. La lista está organizada según la ID externa, con 4 h y 72 h de incubación en la parte superior e inferior, respectivamente.

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
C5	4	ETX010	nº N/A	nº N/A	nº N/A	-1,3
C5	4	ETX012	nº N/A	nº N/A	nº N/A	19,3
C5	4	ETX012 (variante FLP pura)	nº N/A	nº N/A	nº N/A	-6,8

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
C5	4	ETX012 (variante pura - 2Da)	nº N/A	nº N/A	nº N/A	2,6
C5	4	ETX014	51,8	nº N/A	nº N/A	23,7
C5	4	ETX016	nº N/A	nº N/A	nº N/A	4,5
C5	72	ETX010	4,3	72,1	nº N/A	64,9
C5	72	ETX012	3,9	903,9	nº N/A	58,6
C5	72	ETX012 (variante FLP pura)	5,3	338,5	nº N/A	61,2
C5	72	ETX012 (variante pura - 2Da)	2,9	151,0	nº N/A	62,5
C5	72	ETX014	2,2	63,7	nº N/A	65,6
C5	72	ETX016	11,4	nº N/A	nº N/A	48,2

Los resultados de la incubación de 72 h también se muestran en las Figuras 9A-D.

No es visible ningún silenciamiento significativo en el objetivo de los GalNAc-ARNip después de 4 h de incubación. Los datos generados después de un período de incubación de 72 h mostraron un silenciamiento más sólido en el objetivo, de hasta un 65,5 % de inhibición máxima.

5

Análisis de respuesta a la dosis de GalNAc-ARNip dirigidos a hTTR en PHH

El último objetivo de interés, el ARNm de hTTR, se probó nuevamente en una absorción libre gimnótica en PHH en una configuración de respuesta a la dosis idéntica a la de los objetivos hSHAO1 y hSC5, siendo la única diferencia que se usaron secuencias de ARNip específicas para el ARNm de hTTR objetivo (véase la Tabla 1).

10 El experimento finalizó después de 72 h de incubación directa de PHH. La Tabla 7 enumera los datos de actividad de todos los GalNAc-ARNip dirigidos a hTTR estudiados.

Tabla 7: Objetivo, tiempo de incubación, ID externa, IC20/Valores IC50/IC80 e inhibición máxima de hTTR dirigido a GalNAc-ARNip en hepatocitos humanos primarios (PHH). El listado está organizado según el ID externo.

Objetivo	Incubación [h]	ID externa	IC20 [nM]	IC50 [nM]	IC80 [nM]	Inhib. Máx. [%]
hTTR	72	ETX019	3,9	29,8	1536,8	82,5
hTTR	72	ETX021	0,9	16,3	nº N/A	72,6
hTTR	72	ETX023	6,7	377,5	nº N/A	54,8
hTTR	72	ETX025	3,9	nº N/A	nº N/A	46,0

15 Los resultados también se muestran en las Figuras 10A-D.

La absorción gimnótica libre de GalNAc-ARNip dirigidos a hTTR condujo a un silenciamiento significativo en el objetivo en el periodo de las 72 h, oscilando de 46 a 82,5 % de inhibición máxima. Se identificaron los GalNAc-ARNip de hTTR que silencian el ARNm objetivo con valores de IC50 en el intervalo de nM bajo de dos dígitos.

- Conclusiones y discusión

20 El alcance de este estudio fue analizar la actividad in vitro de los GalNAc-ligandos según la presente invención cuando se usan en el contexto de ARNip dirigidos a tres objetivos diferentes, concretamente ARNm de hSHAO1, hSC5 y hTTR. Los conjuntos de ARNip específicos para cada objetivo estaban compuestos de ARNip con diferentes químicas de conector/caperuza/modificación/GalNAc-ligando en el contexto de dos hebras antisentido diferentes cada una.

Para todos los objetivos, se identificaron los GalNAc-ARNip de la Tabla 1 que mostraron una alta potencia general y un bajo valor de IC50.

9.2 Ejemplo 2

Rutas de síntesis

5 i) Síntesis de los bloques de construcción conjugados TriGalNAc

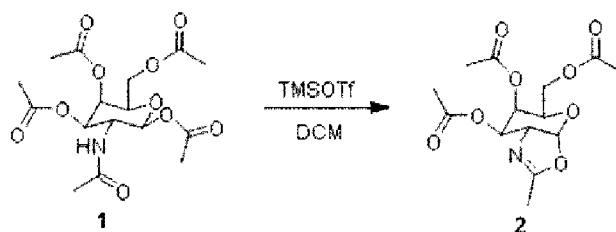
La cromatografía en capa fina (TLC) se realizó en placas de aluminio recubiertas de sílice con indicador de fluorescencia de 254 nm de Macherey-Nagel. Los compuestos se visualizaron bajo luz UV (254 nm) o después de pulverizar con H₂SO₄ al 5 % en metanol (MeOH) o reactivo de ninhidrina según Stahl (de Sigma-Aldrich), seguido de calentamiento. La cromatografía ultrarrápida se realizó con un instrumento de cromatografía ultrarrápida Biotage Isolera One equipado con un detector dual de longitud de onda UV variable (200-400 nm) usando columnas Biotage Sfär Silica de 10, 25, 50 o 100 g (Uppsala, Suecia).

Todas las reacciones sensibles a la humedad se llevaron a cabo en condiciones anhidras usando material de vidrio seco, disolventes anhidros y una atmósfera de argón. Todos los reactivos disponibles comercialmente se adquirieron en Sigma-Aldrich y los disolventes en Carl Roth GmbH + Co. KG. El pentaacetato de D-galactosamina se adquirió de AK Scientific.

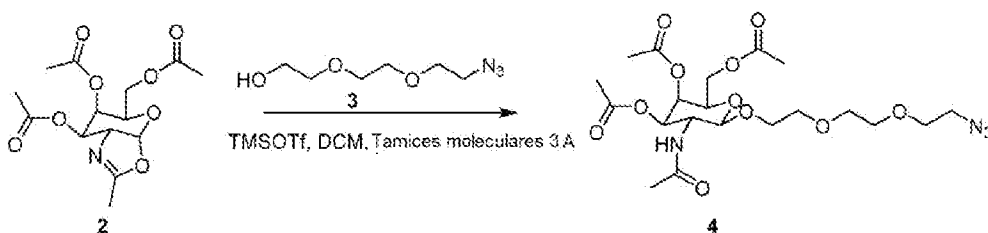
La HPLC/ESI-MS se realizó en un sistema UHPLC Dionex UltiMate 3000 RS y un espectrómetro de masas Thermo Scientific MSQ Plus usando una columna Acquity UPLC Protein BEH C4 de Waters (300 Å, 1,7 µm, 2,1 x 100 mm) a 60 °C. El sistema disolvente consistía en disolvente A con H₂O que contenía 0,1 % de ácido fórmico y disolvente B con acetonitrilo (ACN) que contenía 0,1 % de ácido fórmico. Se empleó un gradiente de 5-100 % de B durante 15 min con un caudal de 0,4 ml/min. Detector y condiciones: Detección de aerosoles corona ultracargados (de esa). Temperatura del nebulizador: 25 °C. Presión de N₂: 242 kPa (35,1 psi). Filtro: Corona.

Se registraron los espectros ¹H y ¹³C RMN a temperatura ambiente en un espectrómetro Varian a 500 MHz (¹H RMN) y 125 MHz (¹³C RMN). Los desplazamientos químicos se dan en ppm con referencia al pico residual del disolvente (CDCl₃ - ¹H RMN: δ a 7,26 ppm y ¹³C RMN δ a 77,2 ppm; DMSO-*d*₆ - ¹H RMN: δ a 2,50 ppm y ¹³C RMN δ a 39,5 ppm). Las constantes de acoplamiento se dan en Hertz. Los patrones de división de señales se describen como singlete (s), doblete (d), triplete (t) o multiplete (m).

ii) Ruta de síntesis del bloque de construcción conjugado TriGalNAc

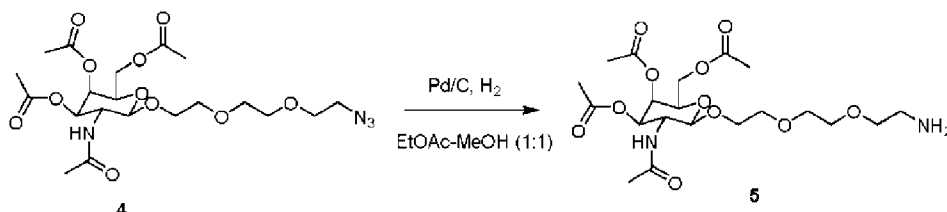


Preparación del compuesto 2: Se disolvió pentaacetato de D-galactosamina (3,00 g, 7,71 mmol, 1,0 eq.) en diclorometano anhidro (DCM) (30 ml) en atmósfera de argón y se añadió trifluorometanosulfonato de trimetilsililo (TMSOTf, 4,28 g, 19,27 mmol, 2,5 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con DCM (50 ml) y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado frío (100 ml) y agua (100 ml). La fase orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ y se concentró para proporcionar el compuesto del título como aceite amarillo, que se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: MeOH de 0-10 % en DCM en 10 CV). El producto se obtuvo como un aceite incoloro (2,5 g, 98 %, rf = 0,45 (MeOH al 2 % en DCM)).

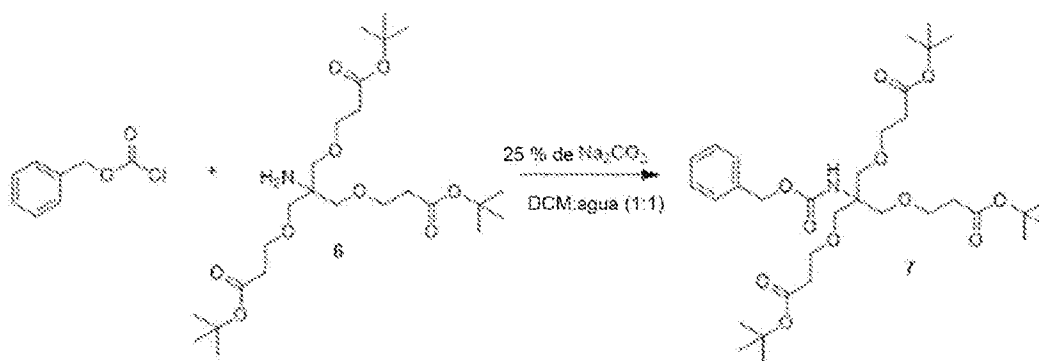


Preparación del compuesto 4: Se disolvieron el compuesto 2 (2,30 g, 6,98 mmol, 1,0 eq.) y azido-PEG3-OH (1,83 g, 10,5 mmol, 1,5 eq.) en DCM anhidro (40 ml) en atmósfera de argón y se añadieron tamices moleculares de 3 Å (5 g) a la disolución. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Luego se añadió a la mezcla TMSOTf (0,77 g, 3,49 mmol, 0,5 eq.) y la reacción se agitó durante la noche. Se filtraron los tamices moleculares, el filtrado se diluyó con DCM (100 ml) y se lavó con NaHCO₃ acuoso saturado frío (100 ml) y agua (100 ml). La fase orgánica se separó,

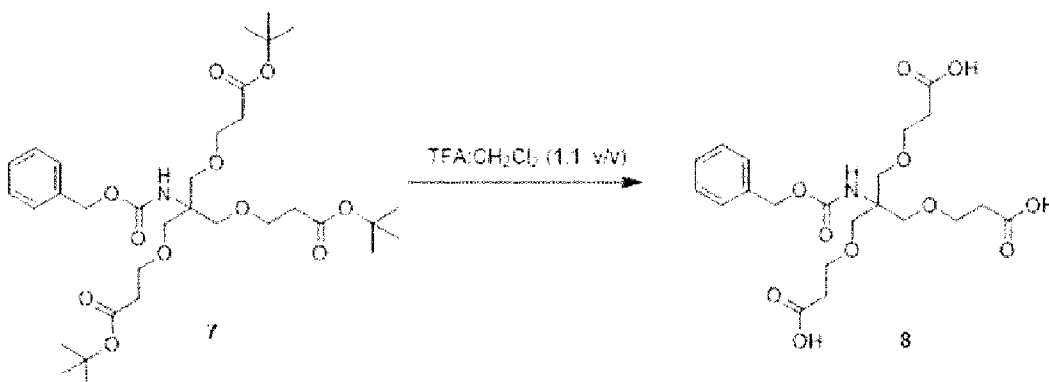
se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó a presión reducida. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: MeOH de 0-3 % en DCM en 10 CV) para proporcionar el producto del título como un aceite de color amarillo claro (3,10 g, 88 %, $r_f = 0,25$ (MeOH al 2 % en DCM)). MS: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_{11}$, 504,21. Encontrado 505,4. ^1H RMN (500 MHz, CDCl_3) δ 6,21-6,14 (m, 1H), 5,30 (dd, $J = 3,4, 1,1$ Hz, 1H), 5,04 (dd, $J = 11,2, 3,4$ Hz, 1H), 4,76 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H), 4,23-4,08 (m, 3H), 3,91-3,80 (m, 3H), 3,74-3,59 (m, 9H), 3,49-3,41 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 2,02 (s, 3H), 1,97 (d, $J = 4,2$ Hz, 6H). ^{13}C RMN (125 MHz, CDCl_3) δ 170,6 (C), 170,5 (C), 170,4 (C), 170,3 (C), 102,1 (CH), 71,6 (CH), 70,8 (CH), 70,6 (CH), 70,5 (CH), 70,3 (CH₂), 69,7 (CH₂), 68,5 (CH₂), 66,6 (CH₂), 61,5 (CH₂), 23,1 (CH₃), 20,7 (3 $\times$ CH₃).



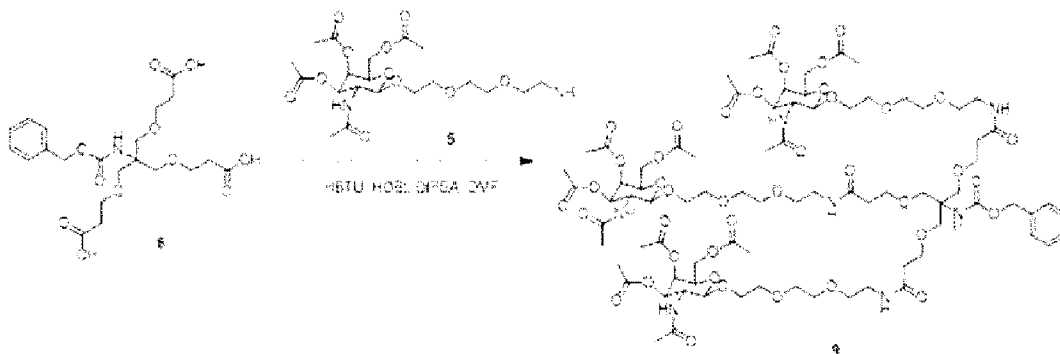
- Preparación del compuesto 5: Se disolvió compuesto 4 (1,00 g, 1,98 mmol, 1,0 eq.) en una mezcla de acetato de etilo (EtOAc) y MeOH (30 ml 1:1 en v/v) y se añadió Pd/C (100 mg). La mezcla de reacción se desgasificó usando ciclos de vacío/argón (3x) y se hidrogenó bajo presión de globo durante la noche. La mezcla de reacción se filtró a través de celite y se lavó con EtOAc (30 ml). El disolvente se eliminó a presión reducida para proporcionar el compuesto del título como un aceite incoloro (0,95 g, rendimiento cuantitativo, $r_f = 0,25$ (MeOH al 10 % en DCM)). El compuesto se usó sin purificación adicional. MS: calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_{11}$, 478,2. Encontrado 479,4.



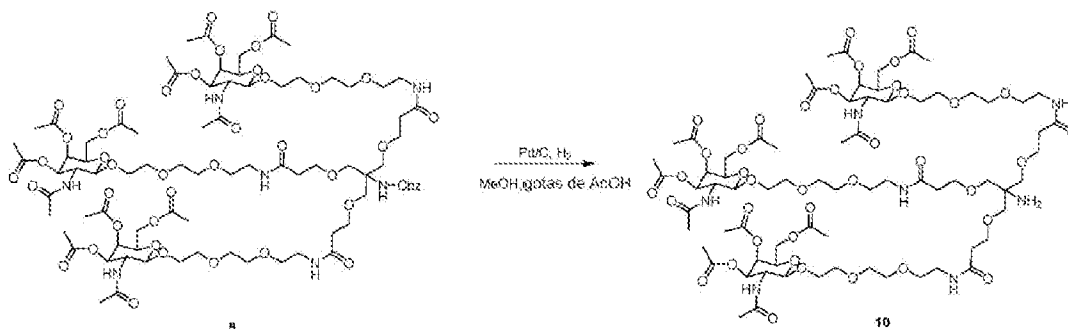
- Preparación del compuesto 7: Se disolvió tris[[2-(terc-butoxicarbonil)etoxi]metil]-metilamina 6 (3,37 g, 6,67 mmol, 1,0 eq.) en una mezcla de DCM/agua (40 ml 1:1 en v/v) y se añadió Na_2CO_3 (0,18 g, 1,7 mmol, 0,25 eq.) mientras se agitaba vigorosamente. Se añadió gota a gota clorofornato de bencilo (2,94 ml, 20,7 mmol, 3,10 eq.) a la mezcla anterior y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla de reacción se diluyó con CH_2Cl_2 (100 mL) y se lavó con agua (100 mL). La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se eliminó a presión reducida y el material bruto resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: EtOAc al 0-10 % en ciclohexano en 12 CV) para proporcionar el compuesto del título como un aceite amarillento pálido (3,9 g, 91 %, $r_f = 0,56$ (EtOAc al 10 % en ciclohexano)). MS: calculado para $\text{C}_{33}\text{H}_{53}\text{NO}_{11}$, 639,3. Encontrado 640,9. ^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,38-7,26 (m, 5H), 4,97 (s, 2H), 3,54 (t, 6H), 3,50 (s, 6H), 2,38 (t, 6H), 1,39 (s, 27H). ^{13}C RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 170,3 (3 $\times$ C), 154,5 (C), 137,1 (C), 128,2 (2 $\times$ CH), 127,7 (CH), 127,6 (2 $\times$ CH), 79,7 (3 $\times$ C), 68,4 (3 $\times$ CH₂), 66,8 (3 $\times$ CH₂), 64,9 (C), 58,7 (CH₂), 35,8 (3 $\times$ CH₂), 27,7 (9 $\times$ CH₃).



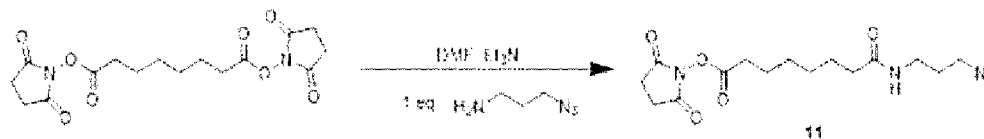
Preparación del compuesto 8: Se disolvió Cbz-NH-tris-Boc-éster 7 (0,20 g, 0,39 mmol, 1,0 eq.) en CH_2Cl_2 (1 ml) en atmósfera de argón, se añadió ácido trifluoroacético (TFA, 1 ml) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se coevaporó 3 veces con tolueno (5 ml) y se secó a alto vacío para obtener el compuesto en forma de su sal de TFA (0,183 g, 98 %). El compuesto se usó sin purificación adicional. MS: calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}$, 471,6. Encontrado 472,4.



Preparación del compuesto 9: Se disolvieron CbzNH-tris-COOH 8 (0,72 g, 1,49 mmol, 1,0 eq.) y GalNAc-PEG3-NH₂ 5 (3,56 g, 7,44 mmol, 5,0 eq.) en *N,N*-dimetilformamida (DMF) (25 ml). Entonces se añadieron a la disolución hexafluorofosfato de *N,N,N',N'*-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU) (2,78 g, 7,44 mmol, 5,0 eq.), hidrato de 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) (1,05 g, 7,44 mmol, 5,0 eq.) y *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) (2,07 ml, 11,9 mmol, 8,0 eq.) y la reacción se agitó durante 72 h. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en DCM (100 ml) y se lavó con NaHCO_3 acuoso saturado (100 ml). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 , el disolvente se evaporó y el material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: MeOH al 0-5 % en DCM en 14 CV). El producto se obtuvo como un aceite amarillento pálido (1,2 g, 43 %, *rf* = 0,20 (MeOH al 5 % en DCM)). MS: calculado para $\text{C}_{81}\text{H}_{125}\text{N}_7\text{O}_{41}$, 1852,9. Encontrado 1854,7. ¹H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 7,90-7,80 (m, 10H), 7,65-7,62 (m, 4H), 7,47-7,43 (m, 3H), 7,38-7,32 (m, 8H), 5,24-5,22 (m, 3H), 5,02-4,97 (m, 4H), 4,60-4,57 (m, 3H), 4,07-3,90 (m, 10H), 3,67-3,36 (m, 70H), 3,23-3,07 (m, 25H), 2,18 (s, 10H), 2,00 (s, 13H), 1,89 (s, 11H), 1,80-1,78 (m, 17H). ¹³C RMN (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 170,1 (C), 169,8 (C), 169,7 (C), 169,4 (C), 169,2 (C), 169,1 (C), 142,7 (C), 126,3 (CH), 123,9 (CH), 118,7 (CH), 109,7 (CH), 100,8 (CH), 70,5 (CH), 69,8 (CH), 69,6 (CH), 69,5 (CH), 69,3 (CH₂), 69,0 (CH₂), 68,2 (CH₂), 67,2 (CH₂), 66,7 (CH₂), 61,4 (CH₂), 22,6 (CH₂), 22,4 (3×CH₃), 20,7 (9×CH₃).

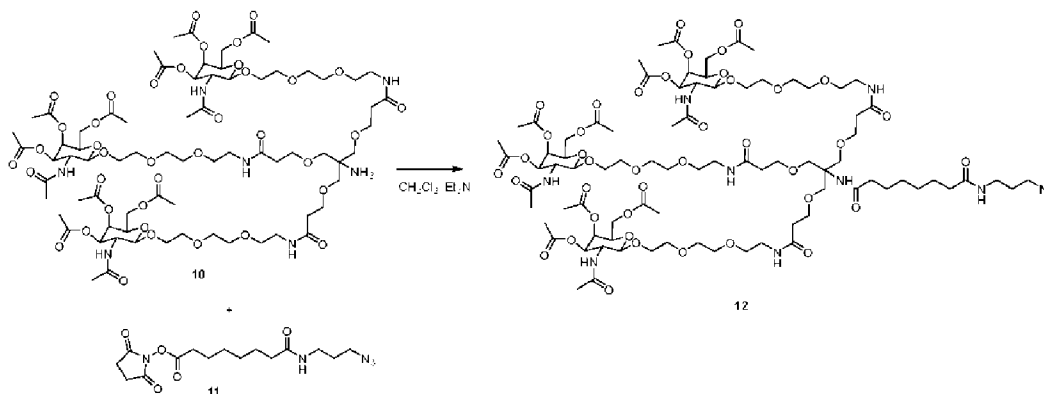


Preparación del compuesto 10: Se disolvió compuesto triantenario GalNAc 9 (0,27 g, 0,14 mmol, 1,0 eq.) en MeOH (15 ml), se añadieron 3 gotas de ácido acético (AcOH) y Pd/C (30 mg). La mezcla de reacción se desgasificó usando ciclos de vacío/argón (3x) y se hidrogenó bajo presión de globo durante la noche. La finalización de la reacción fue seguida por espectrometría de masas y la mezcla resultante se filtró a través de una fina almohadilla de celite. El disolvente se evaporó y el residuo obtenido se secó a alto vacío y se usó para la siguiente etapa sin purificación adicional. El producto se obtuvo como un aceite amarillento pálido (0,24 g, rendimiento cuantitativo). MS: calculado para $\text{C}_{73}\text{H}_{119}\text{N}_7\text{O}_{39}$, 1718,8. Encontrado 1719,3.



Preparación del compuesto 11: Se disolvió bis(éster de *N*-hidroxisuccinimida) de ácido subérico (3,67 g, 9,9 mmol, 1,0 eq.) disponible comercialmente en DMF (5 ml) y se añadió trietilamina (1,2 ml). A esta disolución se añadió gota a gota una disolución de 3-azido-1-propilamina (1,0 g, 9,9 mmol, 1,0 eq.) en DMF (5 ml). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (100 ml) y se lavó con agua (50 ml). La fase orgánica

se separó, se secó sobre Na_2SO_4 y el disolvente se eliminó a presión reducida. El material bruto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (elución en gradiente: MeOH al 0-5 % en DCM en 16 CV). El producto se obtuvo como un sólido blanco (1,54 g, 43 %, $r_f = 0,71$ (MeOH al 5 % en DCM)). MS: calculado para $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_5$, 353,4. Encontrado 354,3.



Preparación de TriGalNac (12): Se disolvieron compuesto triantenario GalNac 10 (0,35 g, 0,24 mmol, 1,0 eq.) y compuesto 11 (0,11 g, 0,31 mmol, 1,5 eq.) en DCM (5 ml) en atmósfera de argón y se añadió trietilamina (0,1 ml, 0,61 mmol, 3,0 eq.). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El disolvente se eliminó a presión reducida, el residuo se disolvió en EtOAc (100 ml) y se lavó con agua (100 ml). La fase orgánica se separó y se secó sobre Na_2SO_4 . El disolvente se evaporó y el material bruto resultante se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (gradiente de elución: MeOH al 0-10 % en DCM en 20 CV) para proporcionar el compuesto del título en forma de un sólido blanco esponjoso (0,27 g, 67 %, $r_f = 0,5$ (MeOH al 10 % en DCM)). MS: calculado para $\text{C}_{84}\text{H}_{137}\text{N}_{11}\text{O}_{41}$, 1957,1. Encontrado 1959,6.

El compuesto 12 se usó para preparaciones posteriores de conjugados de oligonucleótidos empleando "química clic".

iii) Síntesis de oligonucleótidos

Tabla 8:

ID de una sola hebra	Secuencia 5' - 3'	Pureza por HPLC RP (%)
X91382	(NH2-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	89,5
X91383	(NH2-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	91,6
X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	94,0
X91385	(NH2-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	90,6
X91386	(NH2-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	91,2
X91387	(NH2-DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf	88,7
X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	94,2
X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	96,5
X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	91,3

ID de una sola hebra	Secuencia 5' - 3'	Pureza por HPLC RP (%)
X91406	(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	95,0
X91407	(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	97,0
X91408	(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf	90,0
X91415	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)	96,4
X91416	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(NH2C6)	77,4
X91417	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)	96,7
X91418	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NH2C6)	96,0
X91419	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NH2C6)	91,8
X91420	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NH2C6)	93,1
X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauaua(GalNAc)	92,8
X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuuAfuAfaua(GalNAc)	95,7
X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(GalNAc)	92,1
X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaaguscscsa	91,0
X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuusudTdT	90,0
X38104	usCfsuugGfuUfcaugAfaAfucccasusc	95,4
X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	90,0
X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	88,7
X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	89,6

Af, Cf, Gf, Uf: nucleótidos de ARN 2'-F

a, c, g, u: nucleótidos de ARN 2'-O-Me

dT: nucleótidos de ADN

s: fosforotioato

invabasic: 1,2-didesoxirribosa

NH2-DEG: Conector aminoetoxietilo

NH2C12: Conector aminododecilo

NH2C6: conector aminohexilo

Los oligonucleótidos se sintetizaron en fase sólida según el enfoque de fosforamidita. Dependiendo de la escala, se usó un Mermade 12 (BioAutomation Corporation) o un ÄKTA Oligopilot (GE Healthcare).

- 5 Las síntesis se realizaron en soportes sólidos disponibles comercialmente hechos de vidrio de poro controlado, ya sea cargados con invabasic (CPG, 480 Å, con una carga de 86 µmol/g; LGC Biosearch n° cat. BCG-1047-B) o 2'-F A (CPG, 520 Å, con una carga de 90 µmol/g; LGC Biosearch n° cat. BCG-1039-B) o NH2C6 (CPG, 520 Å, con una carga de 85 µmol/g LGC Biosearch n° cat. BCG-1397-B) o GalNAc (CPG, 500 Å, con una carga de 57 µmol/g; Primetech) o 2'-O-Metil C (CPG, 500 Å, con una carga de 84 µmol/g LGC Biosearch n° cat. BCG-10-B) o 2'-O-Metil A (CPG, 497 Å, con una carga de 85 µmol/g, LGC Biosearch, n° Cat. BCG-1029-B) o dT (CPG, 497 Å, con una carga de 87 µmol/g LGC Biosearch, n.º de cat. BCG-1055-B).

Las 2'-O-Me, 2'-F fosforamiditas de ARN y los reactivos secundarios se adquirieron de SAFC Proligo (Hamburgo, Alemania).

En concreto, se usaron las siguientes 2'-O-metilfosforamiditas: 2'-O-metil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-(4,4'-dimetoxitritil)-N-benzil-adenosina, 2'-O-metil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-(4,4'-dimetoxitritil)-N-benzil-citidina, 2'-O-metil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-(4,4'-dimetoxitritil)-N-dimetilformamida-guanosina, 2'-O-metil-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-(4,4'-dimetoxitritil)-uridina.

Se usaron las siguientes 2'-F fosforamiditas: 2'-fluoro-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-dimetoxitritil-N-benzil-desoxiadenosina, 2'-fluoro-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-dimetoxitritil-N-acetil-desoxicitidina, 2'-fluoro-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-dimetoxitritil-N-isobutil-desoxiguanosina y 2'-fluoro-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita de 5'-dimetoxitritil-desoxiuridina.

Para introducir los conectores amino necesarios en el extremo 5' de los oligonucleótidos, se emplearon la 2-[2-(4-monometoxitritil)aminoetoxi]etil-(2-cianoetil)-N,N-diisopropil-fosforamidita (Glen Research Cat. nº 1905) y la 12-(trifluoroacetilamino)dodecil-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (ChemGenes Cat. nº CLP-1575). La modificación invabasic se introdujo usando 5-O-dimetoxitritil-1,2-didesoxirribosa-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-fosforamidita (ChemGenes Cat. nº ANP-1422).

Todos los bloques de construcción se disolvieron en acetonitrilo anhidro (100 mM (Mermade12) o 200 mM (ÅKTA Oligopilot)) que contenía tamices moleculares (3 Å) excepto fosforamidita de 2'-O-metil-uridina que se disolvió en DCM anhidro al 50 % en acetonitrilo anhidro. Se usó yodo (50 mM en piridina/H₂O 9:1 en v/v) como reactivo oxidante. Como disolución activadora se usó 5-etiltetrazol (ETT, 500 mM en acetonitrilo). La tiolación para la introducción de enlaces fosforotioato se llevó a cabo usando hidruro de xantano 100 mM (TCI, nº de catálogo 6846-35-1) en acetonitrilo/piridina 4:6 en v/v.

Los tiempos de acoplamiento fueron 5,4 minutos salvo que se indique lo contrario. Se incorporaron modificaciones amino 5' a la secuencia empleando una etapa de acoplamiento doble con un tiempo de acoplamiento de 11 minutos por cada acoplamiento (tiempo total de acoplamiento 22 min). El tiempo de contacto con el oxidante se ajustó a 1,2 min y el tiempo de tiolación fue de 5,2 min.

Las secuencias se sintetizaron eliminando el grupo DMT final, con excepción del grupo MMT de las secuencias NH2DEG.

Al final de la síntesis, los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido usando una disolución en volumen 1:1 de hidróxido de amonio al 28-30 % (Sigma-Aldrich, Cat. nº 221228) y metilamina acuosa al 40 % (Sigma-Aldrich, Cat. nº 8220911000) durante 16 horas a 6 °C. Luego se separó por filtración el soporte sólido, se lavó minuciosamente el filtro con H₂O y el volumen de la disolución combinada se redujo mediante evaporación a presión reducida. El pH de la disolución resultante se ajustó a pH 7 con AcOH al 10 % (Sigma-Aldrich, Cat. nº A6283).

Los materiales brutos se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP) o HPLC de intercambio aniónico (AEX).

La purificación por HPLC RP se realizó usando una columna XBridge C18 Prep de 19 × 50 mm (Waters) en un instrumento ÅKTA Pure (GE Healthcare). El tampón A era acetato de trietilamonio 100 mM (TEAAc, Biosolve) pH 7 y el tampón B contenía acetonitrilo al 95 % en el tampón A. Se empleó un caudal de 10 ml/min y una temperatura de 60 °C. Se registraron trazas de UV a 280 nm. Se empleó un gradiente de B al 0 % a B al 100 % dentro de 120 volúmenes de columna. Las fracciones apropiadas se reunieron y precipitaron en el congelador con acetato de sodio (NaOAc) 3 M (Sigma-Aldrich), pH 5,2 y etanol al 85 % (VWR). Los sedimentos se aislaron mediante centrifugación, se redisolvieron en agua (50 ml), se trataron con NaCl 5 M (5 ml) y se desalinizaron mediante HPLC de exclusión por tamaño en un instrumento Åkta Pure usando una columna ECO de 50 × 165 mm (YMC, Dinslaken, Alemania) llena de Resina fina Sephadex G25 (GE Healthcare).

La purificación por HPLC AEX se realizó usando un gel TSK SuperQ-5PW 20 × 200 mm (BISCHOFFChromatography) en un instrumento ÅKTA Pure (GE Healthcare). El tampón A era fosfato de sodio 20 mM (Sigma-Aldrich) pH 7,8 y el tampón B era el mismo que el tampón A con la adición de bromuro de sodio 1,4 M (Sigma-Aldrich). Se empleó un caudal de 10 ml/min y una temperatura de 60 °C. Se registraron trazas de UV a 280 nm. Se empleó un gradiente de B al 10 % a B al 100 % dentro de 27 volúmenes de columna. Se reunieron las fracciones apropiadas y se precipitaron en el congelador con NaOAc 3 M, pH 5,2 y etanol al 85 %. Los sedimentos se aislaron mediante centrifugación, se redisolvieron en agua (50 ml), se trataron con NaCl 5 M (5 ml) y se desalinizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

El grupo MMT se eliminó con ácido acético al 25 % en agua. Una vez completada la reacción, la disolución se neutralizó y las muestras se desalinizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

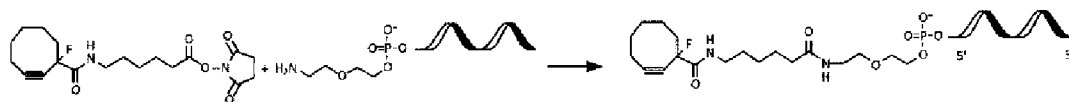
Las hebras individuales se analizaron mediante LC-MS analítica en una columna XBridge C18 de 2,1 × 50 mm (Waters) en un sistema de HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific) combinado con un espectrómetro de masas LCQ Deca XP-plus Q-ESI-TOF (Thermo Finnigan) o con un espectrómetro de masas Compact ESI-Qq-TOF (Bruker Daltonics). El tampón A era trietilamina 16,3 mM, 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFIP) 100 mM y MeOH al 1 % en H₂O y el tampón B contenía el tampón A en MeOH al 95 %. Se empleó un caudal de 250 µl/min y una temperatura de 60 °C. Se registraron trazas de UV a 260 y 280 nm. Se empleó un gradiente de B al 1-40 % en un periodo de 0,5 min

seguido de B al 40 a 100 % en un periodo de 13 min. Metanol (grado LC-MS), agua (grado LC-MS), 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (puriss. p.a.) y trietilamina (puriss. p.a.) se adquirieron de Sigma- Aldrich.

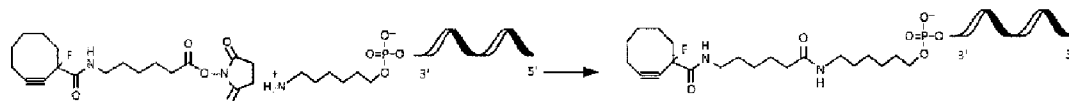
iv) Conjugación de monofluorociclooctino (MFCO) en el extremo 5' o 3'

Conjugación de MFCO en el extremo 5'

5



Conjugación de MFCO en el extremo 3'



10

Condiciones generales para la conjugación de MFCO: La hebra sencilla modificada con amina se disolvió a 700 OD/mL en tampón carbonato/bicarbonato 50 mM, pH 9,6/dimetilsulfóxido (DMSO) 4:6 (v/v) y a esta disolución se le añadió un equivalente molar de una disolución 35 mM de éster MFCO-C6-NHS (Berry&Associates, Cat. n° LK 4300) en DMF. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y después de 1 h se añadió otro equivalente molar de la disolución de MFCO. Se dejó que la reacción prosiguiera durante una hora adicional y se monitorizó mediante LC/MS. Se necesitaron al menos dos equivalentes molares en exceso del reactivo éster MFCO NHS con respecto al oligonucleótido modificado con amina para lograr el consumo cuantitativo del material de partida. La mezcla de reacción se diluyó 15 veces con agua, se filtró a través de un filtro de 1,2 µm de Sartorius y luego se purificó mediante fase inversa (HPLC RP) en un instrumento Äkta Pure (GE Healthcare).

15

20

La purificación se realizó usando una columna XBridge C18 Prep de 19 x 50 mm de Waters. El tampón A era TEAAc 100 mM, pH 7 y el tampón B contenía acetonitrilo al 95 % en el tampón A. Se empleó un caudal de 10 ml/min y una temperatura de 60 °C. Se registraron trazas de UV a 280 nm. Se empleó un gradiente de B de 0-100 % dentro de 60 volúmenes de columna.

Se reunieron las fracciones que contenían oligonucleótido conjugado de longitud completa, se precipitaron en el congelador con NaOAc 3 M, pH 5,2 y etanol al 85 % y el sedimento recogido se disolvió en agua. Las muestras se desalinizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y se concentraron usando un concentrador speed-vac para proporcionar el oligonucleótido conjugado con un rendimiento aislado del 40-80 %.

25

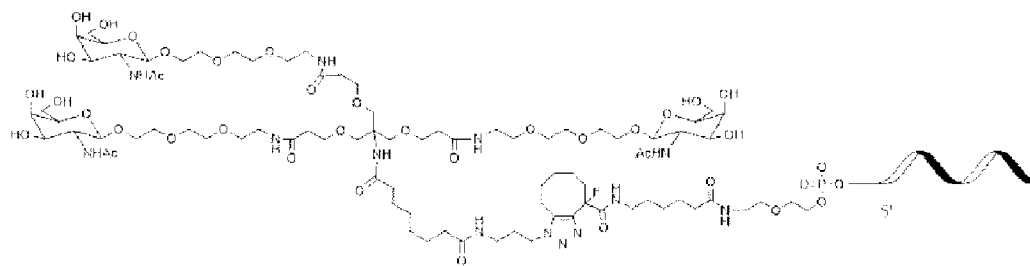
Tabla 9:

ID la hebra sentido	Secuencia de la hebra sentido 5' - 3'	Pureza por HPLC RP (%)
X91388	(MFCO)(NH- DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	89,0
X91389	(MFCO)(NH- DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic)	91,0
X91390	(MFCO)(NH- DEG)ugggauUfuCfaUfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	90,0
X91391	(MFCO)(NH-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	86,0
X91392	(MFCO)(NH-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfasusAf	87,0
X91393	(MFCO)(NH-DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf	86,0
X91421	(invabasic)(invabasic)gsacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6) (MFCO)	94,0

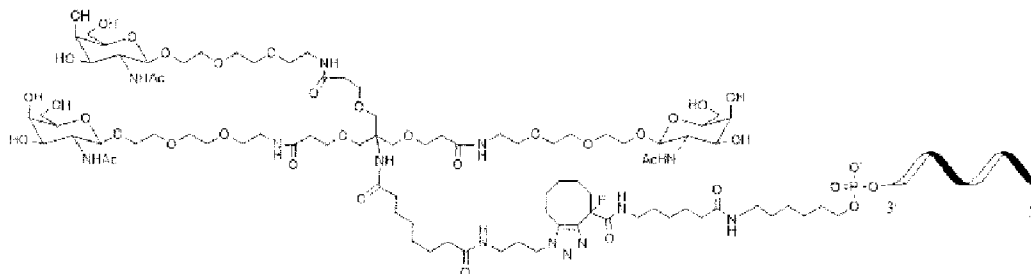
ID la hebra sentido	Secuencia de la hebra sentido 5' - 3'	Pureza por HPLC RP (%)
X91422	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfua(NHC6)(MFCO)	89,0
X91423	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)	89,0
X91424	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6) (MFCO)	90,0
X91425	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6) (MFCO)	89,0
X91426	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6) (MFCO)	89,0

v) Conjugación de TriGalNAc (GalNAc-T1) en el extremo 5' o 3'

Conjugados de 5'-GalNAc-T1



5 Conjugados de 3'-GalNAc-T1



Procedimiento general para la conjugación de TriGalNAc: Se disolvió una hebra individual modificada con MFCO a 2000 OD/ml en agua y a esta disolución se le añadió una disolución equivalente del compuesto 12 (10 mM) en DMF. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente y después de 3 h se añadieron 0,7 equivalentes molares de la disolución del compuesto 12. Se dejó que la reacción transcurriera durante la noche y se monitorizó su finalización mediante LCMS. El conjugado se diluyó 15 veces en agua, se filtró a través de un filtro de 1,2 µm de Sartorius y luego se purificó mediante HPLC RP en un instrumento Äkta Pure (GE Healthcare).

La purificación por HPLC RP se realizó usando una columna XBridge C18 Prep de 19 x 50 mm de Waters. El tampón A era acetato de trietilamonio 100 mM, pH 7, y el tampón B contenía acetonitrilo al 95 % en el tampón A. Se empleó un caudal de 10 ml/min y una temperatura de 60 °C. Se registraron trazas de UV a 280 nm. Se empleó un gradiente de B al 0-100 % dentro de 60 volúmenes de columna.

Se reunieron las fracciones que contenían oligonucleótido conjugado de longitud completa, se precipitaron en el congelador con NaOAc 3 M, pH 5,2 y etanol al 85 % y el sedimento recogido se disolvió en agua para dar una disolución de oligonucleótido de aproximadamente 1000 OD/ml. Los O-acetatos se eliminaron añadiendo amoníaco acuoso al 20 %. La eliminación cuantitativa de estos grupos protectores se verificó mediante LC-MS.

Los conjugados se desalinizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando resina fina Sephadex G25 (GE Healthcare) en un instrumento Äkta Pure (GE Healthcare) para proporcionar el nucleótido conjugado con un rendimiento aislado del 50-70 %.

Tabla 10:

ID de hebra sentido	Secuencia de hebra sentido 5' - 3'	Pureza por HPLC RP (%)
X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	80,0
X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfaAfasusa(invabasic)(invabasic)	87,8
X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	87,9
X91397	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	83,0
X91399	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	80,5
X91401	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf	81,7
X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	88,0
X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfaAfa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	82,6
X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	82,9
X91430	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	83,0
X91431	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	82,6
X91432	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	81,2

vi) Hibridación dúplex

5 Para generar el dúplex de ARNip deseado, las dos hebras complementarias se hibridaron combinando disoluciones acuosas equimolares de ambas hebras. Las mezclas se colocaron en un baño de agua a 70 °C durante 5 minutos y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un periodo de 2 h. Los dúplex se liofilizaron durante 2 días y se almacenaron a -20 °C.

10 Los dúplex se analizaron mediante HPLC SEC analítica en una columna de aumento Superdex™ 75 5/150 GL 5 × 153-158 mm (Cytiva) en un sistema HPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific). La fase móvil consistió en 1x PBS que contenía acetonitrilo al 10 %. Se realizó un gradiente isocrático en 10 min a un caudal de 1,5 ml/min a temperatura ambiente. Se registraron trazas de UV a 260 y 280 nm. El agua (calidad LC-MS) se adquirió de Sigma-Aldrich y la disolución salina tamponada con fosfato (PBS; 10x, pH 7,4) se adquirió de GIBCO (Thermo Fisher Scientific).

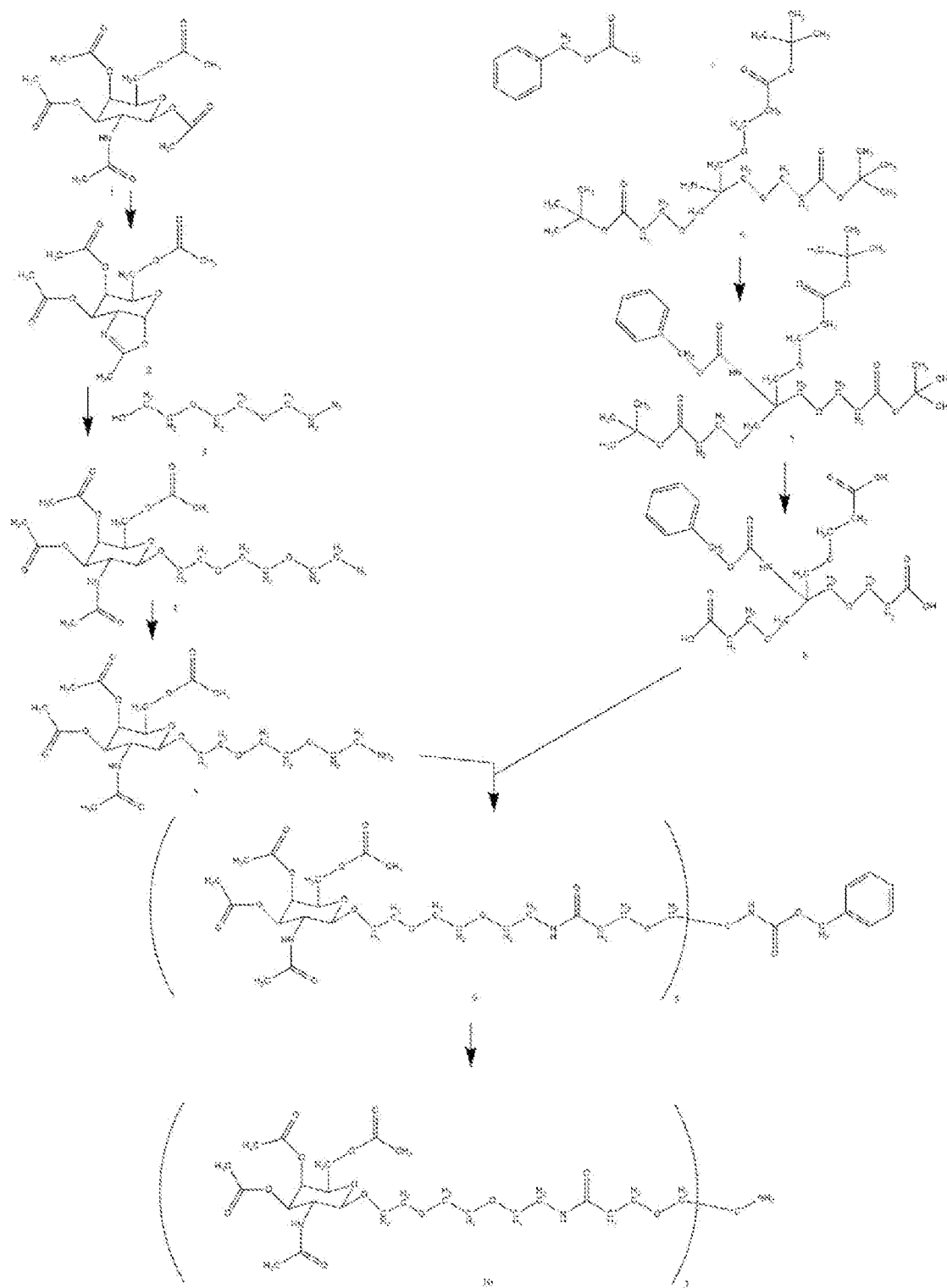
Los conjugados de GalNAc preparados se recopilan en la siguiente tabla. Estos estaban dirigidos contra 3 genes objetivo diferentes. Se captura la codificación del ARNip junto con las correspondientes hebras individuales, la información de la secuencia además de la pureza de los dúplex.

Tabla 11:

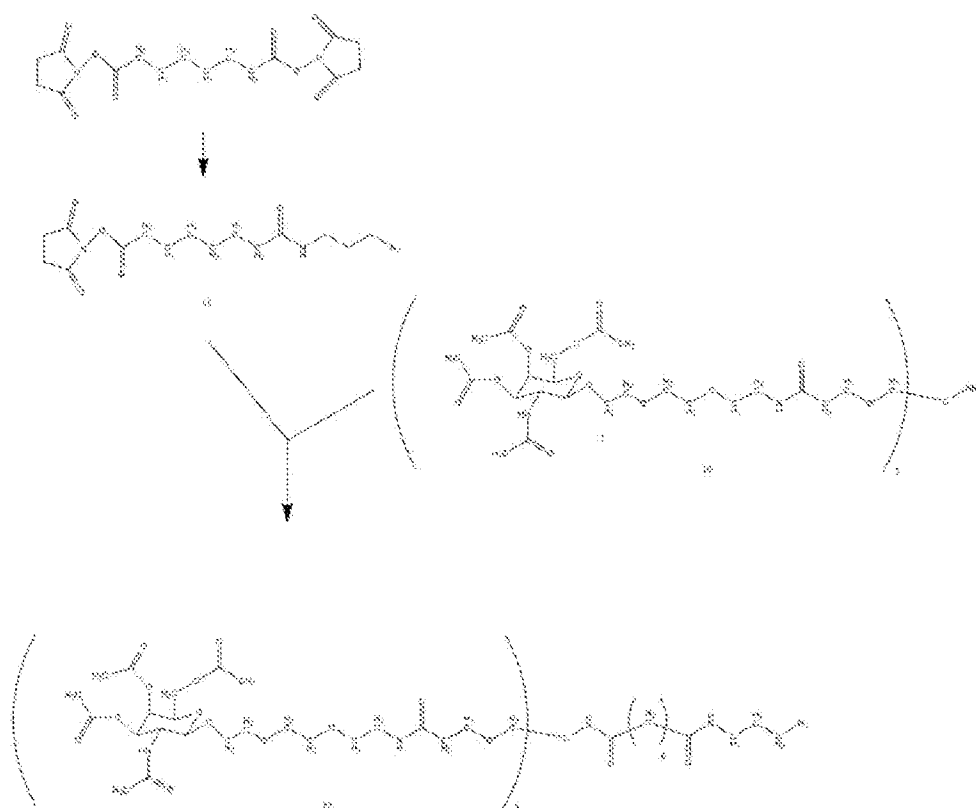
Objetivo	ID del Dúplex	ID del ssRN	Secuencia de ssARN 5'-3'	Pureza del dúplex por HPLC (%)
GO	ETX001	X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NHDEG)gacuuuCfaUfCfcfuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)	96,8
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
	ETX003	X91397	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf	97,6
		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	
	ETX005	X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuuCfaUfCfcfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	92,8
		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaagucscsa	
	ETX007	X91430	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfuAf(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	96,8
		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUfcsCfsa	
C5	ETX010	X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)	96,4
		X91381	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	
	ETX012	X91399	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAf	97,1
		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	
	ETX014	X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	97,2
		X91381	usAfsUfuAfaAfaAfaUfcUfuGfcuusudTdT	
	ETX016	X91431	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfuAf(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	96,8
		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT	
TTR	ETX019	X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfaUfuguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)	97,2
		X38104	usCfsuugGfuUafcaugAfaAfucccasusc	
	ETX021	X91401	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsGsAf	95,5
		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	
	ETX023	X91429	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfaUfuguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	96,3
		X38104	usCfsuugGfuUafcaugAfaAfucccasusc	
	ETX025	X91432	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfgAf(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)	97,5
		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCfasUfsc	

Los siguientes esquemas establecen además las rutas de síntesis:

Esquema 1:

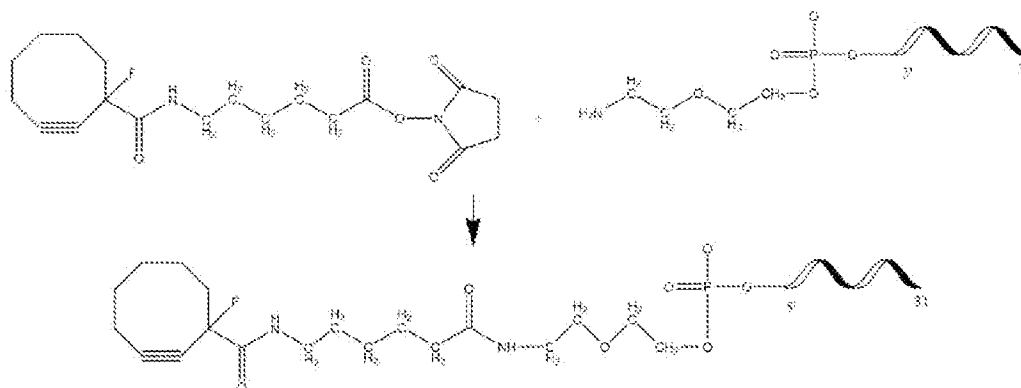


Esquema 2:

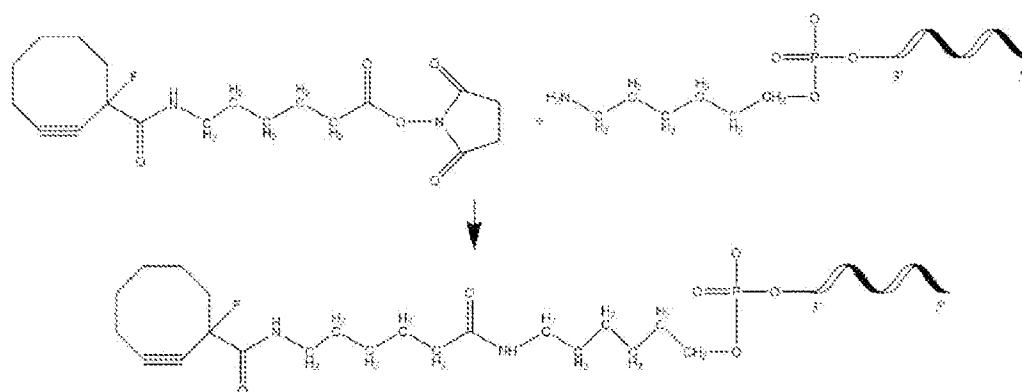


Esquema 3:

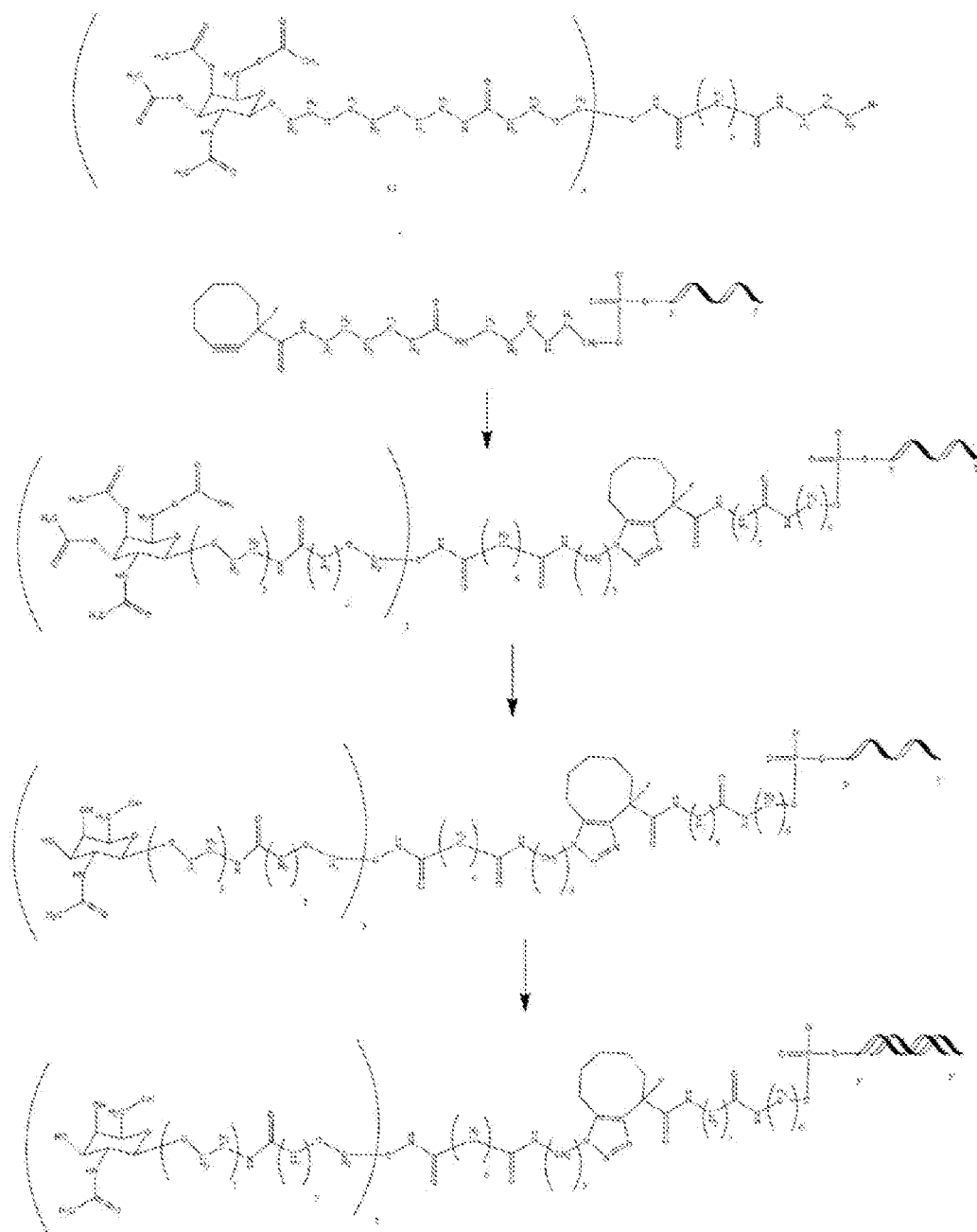
Conjugación de MFPO en el extremo 5'

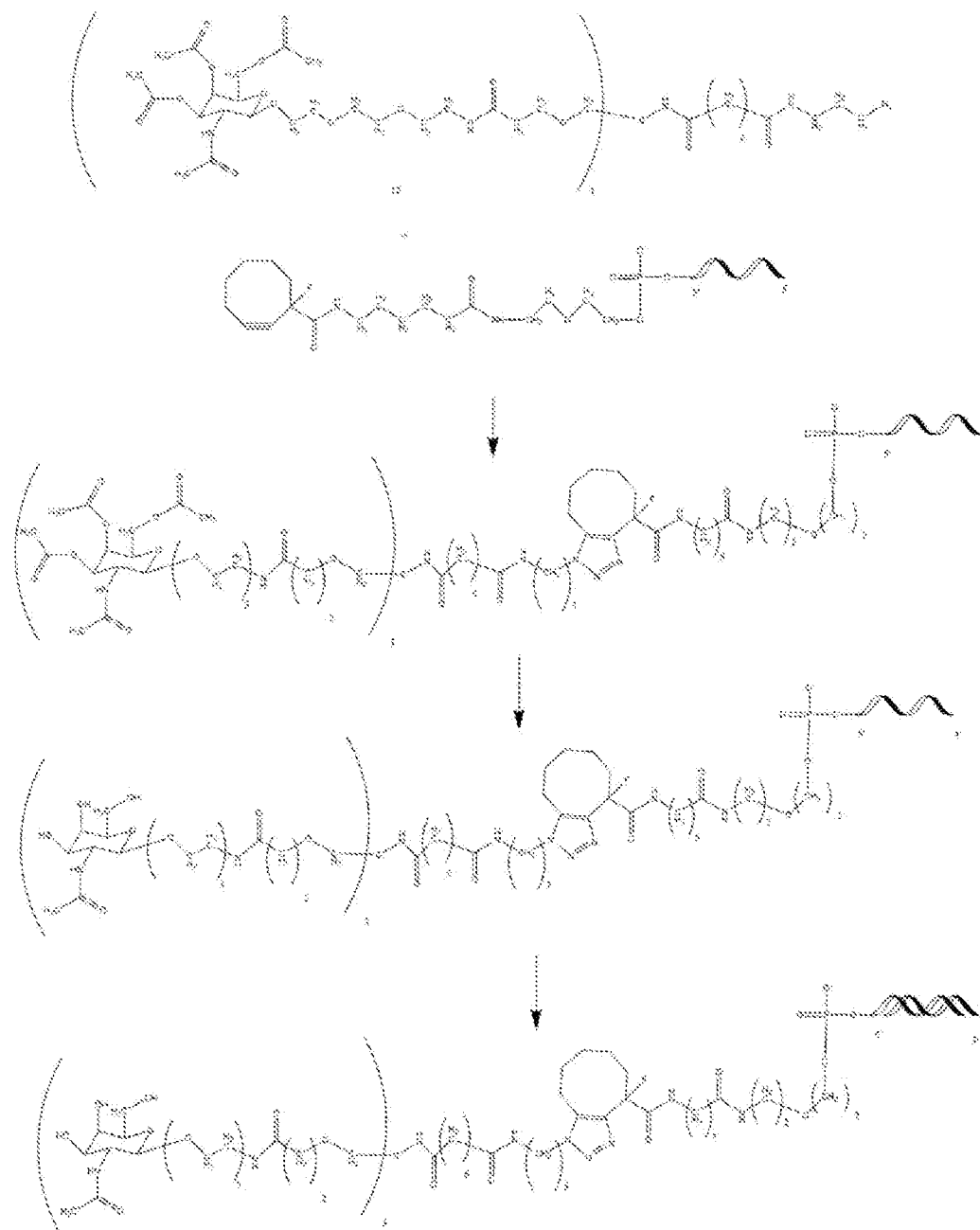


Conjugación de MFPG en el extremo 3'



Esquema 4:



Esquema 5:**Ejemplo 3**

Datos de ratón para constructos de GalNAc-ARNip ETX005 y ETX014

ETX005 (dirigido al ARNm de HAO1) T1a abásico invertido

- 5 Se realizó un estudio de farmacología en ratones *in vivo* que mostró el bloqueo del ARNm de HAO1 en el tejido hepático con un aumento asociado en el nivel de glicolato sérico después de una dosis subcutánea única de hasta 3 mg/kg de ARNip modificado conjugado con GalNAc ETX005.

10 Se asignaron aleatoriamente ratones macho C57BL/6 con una edad de aproximadamente 8 semanas a grupos de 21 ratones. El día 0 del estudio, los animales recibieron una dosis subcutánea única de 0,3 o 3 mg/kg de GalNAc-ARNip disuelto en disolución salina (cloruro de sodio al 0,9 % estéril) o disolución salina solo como control. El día 1, el día 2, el día 4, el día 7, el día 14, el día 21 y el día 28 del estudio, se sacrificaron 3 ratones de cada grupo y se tomaron

muestras de suero e hígado.

Se tomó suero de un grupo de 5 ratones no tratados el día 0 para proporcionar una medición inicial de la concentración de glicolato.

- 5 El suero se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. La muestra de hígado (aproximadamente 50 mg) se trató con ARN más tarde y se almacenó durante la noche a 4 °C, antes de almacenarse a -80 °C.

Las muestras de hígado se analizaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real para el ARNm de HAO1 (ID del ensayo de Thermo Mm00439249_m1) y el ARNm del gen de mantenimiento GAPDH (ID del ensayo de Thermo Mm99999915_g1). Se usó el método delta delta Ct para calcular los cambios en la expresión de HAO1 normalizada a GAPDH y en relación con el grupo de control de disolución salina.

- 10 Una dosis única de 3 mg/kg de ETX005 inhibió la expresión del ARNm de HAO1 en más del 80 % después de 7 días (FIG. 11). La supresión de la expresión de HAO1 fue duradera, con una dosis única de 3 mg/kg de ETX005 que mantuvo más del 60 % de inhibición del ARNm de HAO1 al final del estudio el día 28. Una dosis única de 0,3 mg/kg de ETX005 también inhibió la expresión de HAO1 en comparación con el grupo de control de disolución salina, alcanzando los niveles de expresión de HAO1 niveles normales solo en el día 28 del estudio.

- 15 Se espera que la supresión de la expresión del ARNm de HAO1 provoque un aumento en los niveles de glicolato sérico. La concentración de glicolato sérico se midió usando LC-MS/MS (FIG. 12). Una dosis única de 3 mg/kg de ETX005 provocó un aumento significativo en la concentración de glicolato sérico, alcanzando niveles máximos 14 días después de la dosificación y permaneciendo por encima del nivel inicial (día 0) y del grupo de control de disolución salina hasta el final del estudio el día 28. Una dosis única de 0,3 mg/kg de ETX005 mostró un aumento menor y más transitorio en la concentración de glicolato sérico por encima del nivel observado en un grupo de referencia y de control de disolución salina, lo que demuestra que una dosis muy pequeña puede suprimir el ARNm de HAO1 en una magnitud suficiente para afectar la concentración. de un biomarcador metabólico en suero.
- 20

ETX014 (dirigido al ARNm de C5) T1a abásico invertido

- 25 Se realizó un estudio de farmacología en ratones *in vivo* que mostró el bloqueo del ARNm de C5 en el tejido hepático y la disminución resultante en la concentración sérica de proteína C5 después de una dosis subcutánea única de hasta 3 mg/kg de ARNip modificado conjugado con GalNAc ETX014.

- 30 Se asignaron aleatoriamente ratones macho C57BL/6 con una edad de aproximadamente 8 semanas a grupos de 21 ratones. El día 0 del estudio, los animales recibieron una dosis subcutánea única de 0,3, 1 o 3 mg/kg de GalNAc-ARNip disuelto en disolución salina (cloruro de sodio estéril al 0,9%) o disolución salina solo como control. El día 1, el día 2, el día 4, el día 7, el día 14, el día 21 y el día 28 del estudio, se sacrificaron 3 ratones de cada grupo y se tomaron muestras de suero e hígado.

El suero se almacenó a -80 °C hasta su posterior análisis. La muestra de hígado (aproximadamente 50 mg) se trató con ARN más tarde y se almacenó durante la noche a 4 °C, antes de almacenarse a -80 °C.

- 35 Las muestras de hígado se analizaron usando PCR cuantitativa en tiempo real para el ARNm de C5 (ID del ensayo de Thermo Mm00439275_m1) y el ARNm del gen de mantenimiento GAPDH (ID del ensayo de Thermo Mm99999915_g1). Se usó el método delta delta Ct para calcular los cambios en la expresión de C5 normalizada a GAPDH y en relación con el grupo de control de disolución salina.

- 40 ETX014 inhibió la expresión del ARNm de C5 de una manera dependiente de la dosis (FIG. 13) logrando la dosis de 3 mg/kg una reducción superior al 90 % en el ARNm de C5 el día 14. La supresión de la expresión de C5 por ETX014 fue duradera, mostrando la dosis de 3 mg/kg de cada molécula que muestra un claro bloqueo del ARNm de C5 hasta el final del estudio el día 28.

Para el análisis del nivel de proteína C5, las muestras de suero se midieron usando un kit ELISA C5 disponible comercialmente (Abcam ab264609). Los niveles séricos de C5 se calcularon en relación con las medias del grupo de disolución salina en momentos coincidentes.

- 45 Los datos de proteínas séricas respaldan el análisis de ARNm (FIG. 14). El tratamiento con ETX014 provocó una disminución dependiente de la dosis en la concentración de proteína C5 sérica. Todas las dosis de ETX014 redujeron los niveles de proteína C5 en más del 70 %, reduciendo la dosis de 3 mg/kg los niveles de C5 a niveles casi indetectables en el día 7 del estudio. La reducción del C5 sérico se mantuvo con todas las dosis hasta la finalización del estudio, e incluso la dosis más baja de 0,3 mg/kg todavía mostraba una inhibición de aproximadamente el 40 % en el día 28.
- 50

Ejemplo 4 Datos de NHP para el constructo de ETX023 de GalNAc-ARNip

ETX023 (ARNm de TTR dirigido) T1a abásico invertido

La farmacología de ETX023 se evaluó en primates no humanos (NHP) cuantificando los niveles de proteína transtiretina (TTR) en suero. Una dosis subcutánea única de 1 mg/kg de ARNip modificado conjugado con GalNAc ETX023 demostró una supresión duradera de la expresión de la proteína TTR.

Se asignaron monos cynomolgus machos (de 3 a 5 años de edad, de 2 a 3 kg) en grupos de 3 animales. Los animales se aclimataron durante 2 semanas y se les extrajo sangre 14 días antes de la dosificación para proporcionar la concentración inicial de TTR. Se realizó una biopsia de hígado 18 o 38 días antes de la administración para proporcionar los niveles iniciales de ARNm. El día 0 del estudio, los animales recibieron una dosis subcutánea única de 1 mg/kg de GalNAc-ARNip ETX023 disuelto en disolución salina (cloruro de sodio estéril al 0,9%). El día 3, día 14, día 28, día 42, día 56, día 70 y día 84 del estudio, se tomó una biopsia de hígado y se extrajo ARN para medir el ARNm de TTR. El día 1, el día 3, el día 7, el día 14, el día 28, el día 42, el día 56, 70 y el día 84 del estudio, se tomó una muestra de sangre para medir la concentración sérica de TTR y el análisis de química sanguínea clínica.

Se espera que la supresión de la expresión del ARNm de TTR provoque una disminución de los niveles séricos de proteína TTR. La concentración de proteína TTR en suero se midió mediante un kit ELISA disponible comercialmente (Abcam ab231920). Se calculó la concentración de TTR como una fracción del día 1 para cada animal individual y esto se representó como media y desviación estándar para el grupo de 3 animales (FIG. 15).

Una dosis única de 1 mg/kg de ETX023 provocó una reducción rápida y significativa en la concentración sérica de TTR, alcanzando el punto más bajo 28 días después de la dosificación y permaneciendo suprimida hasta el día 70.

Se obtuvieron datos adicionales hasta el día 84. Se llevaron a cabo experimentos idénticos usando ETX019, 021, 025. Los datos se proporcionan para 84 días en las Figuras 16, 17, 18a y 19 (ETX019, 021, 023 y 025 respectivamente).

El ARNm de TTR se midió mediante PCR cuantitativa en tiempo real usando un kit de expresión TTR TaqMan Gene (Thermo, ID de ensayo Mf02799963_m1). También se midió la expresión de GAPDH (Thermo, ID de ensayo Mf04392546_g1) para proporcionar una referencia. La expresión relativa de TTR para cada animal se calculó normalizada con respecto a GAPDH y en relación con los niveles previos a la dosis mediante el método DDCT. Una dosis única de 1 mg/kg de ETX023 también provocó una reducción rápida y significativa en el ARNm de TTR hepático, alcanzando el punto más bajo 14 días después de la dosificación y permaneciendo suprimido hasta el día 84 (FIG. 18b).

El peso corporal de los animales se midió una vez por semana durante el estudio. No se asociaron fluctuaciones ni disminuciones en el peso corporal con la dosificación de ETX023 y los animales continuaron ganando peso durante todo el estudio (FIG. 18c).

El suero se analizó en un periodo de 2 horas utilizando un analizador bioquímico automático. Un aumento significativo de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) se usa comúnmente para demostrar toxicidad hepática. No se asoció ningún aumento en ALT (FIG. 18d) o ALT (FIG. 18e) con la dosificación de ETX023.

En aspectos preferidos, los compuestos de la invención son capaces de reducir el nivel de proteína sérica de una proteína objetivo a un valor por debajo de la concentración inicial (inicial) en el día 0, durante un periodo de hasta al menos aproximadamente 14 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 21 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 28 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 35 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 42 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 49 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 56 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 63 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 70 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 77 días después del día 0, o hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0, en lo sucesivo denominado "duración de la dosis". "Día 0", como se hace referencia en la presente memoria, es el día en donde se inicia la dosificación de un compuesto de la invención a un paciente, en otras palabras, el inicio de la duración de la dosis o el tiempo posterior a la dosis.

En aspectos preferidos, los compuestos de la invención son capaces de reducir el nivel de proteína sérica de una proteína objetivo a un valor de al menos aproximadamente 90 % o por debajo de la concentración inicial (de partida) en el día 0, tal como al menos aproximadamente 85 % o por debajo, al menos aproximadamente 80 % o por debajo, al menos aproximadamente 75 % o por debajo, al menos aproximadamente 70 % o por debajo, al menos aproximadamente 65 % o por debajo, al menos aproximadamente 60 % o por debajo, al menos aproximadamente 55 % o por debajo, en al menos aproximadamente el 50 % o por debajo, al menos aproximadamente el 45 % o por debajo, al menos aproximadamente el 40 % o por debajo, al menos aproximadamente el 35 % o por debajo, al menos aproximadamente el 30 % o por debajo, al menos aproximadamente el 25 % o por debajo, al menos aproximadamente el 20 % o por debajo, al menos aproximadamente 15 % o por debajo, al menos aproximadamente 10 % o menos, al menos aproximadamente 5 % o por debajo, de la concentración inicial (de partida) en el día 0. Normalmente, dicha depresión de la proteína sérica se puede mantener durante un periodo de hasta al menos aproximadamente 14 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 21 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 28 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 35 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 42 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 49 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 56 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 63 días después del día 0, hasta al

menos aproximadamente 70 días después del día 0, hasta al menos aproximadamente 77 días después del día 0, o hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0. Más preferiblemente, en un período de hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0, la proteína sérica se puede reducir a un valor de al menos aproximadamente 90 % o por debajo de la concentración inicial (de partida) en el día 0, tal como al menos aproximadamente 85 % o por debajo, al menos aproximadamente 80 % o por debajo, al menos aproximadamente 75 % o por debajo, al menos aproximadamente 70 % o por debajo, al menos aproximadamente 65 % o por debajo, al menos aproximadamente 60 % o por debajo, al menos aproximadamente 55 % o por debajo, al menos aproximadamente 50 % o por debajo, al menos aproximadamente 45 % o por debajo, al menos aproximadamente 40 % o por debajo, de la concentración inicial (de partida) en el día 0.

- En aspectos preferidos, los compuestos de la invención son capaces de lograr una disminución máxima del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo a un valor de al menos aproximadamente 50 % o por debajo de la concentración inicial (de partida) en el día 0, tal como al menos aproximadamente 45 % o por debajo, al menos aproximadamente 40 % o por debajo, al menos aproximadamente 35 % o por debajo, al menos aproximadamente 30 % o por debajo, al menos aproximadamente 25 % o por debajo, al menos aproximadamente 20 % o por debajo, al menos aproximadamente 15 % o por debajo, al menos aproximadamente el 10 % o por debajo, al menos aproximadamente el 5 % o por debajo, de la concentración inicial (de partida) en el día 0. Normalmente, dicha disminución máxima de la proteína sérica se produce aproximadamente el día 14 después del día 0, aproximadamente el día 21 después del día 0, aproximadamente el día 28 después del día 0, aproximadamente el día 35 después del día 0, o aproximadamente el día 42 después del día 0. Más normalmente, dicha disminución máxima de la proteína sérica ocurre aproximadamente el día 14 después del día 0, aproximadamente el día 21 después del día 0, o aproximadamente el día 28 después del día 0.

Los compuestos específicos de la invención normalmente pueden lograr un % de disminución máximo del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo y/o un % de disminución durante un período de hasta al menos aproximadamente 84 días como sigue:

- ETX019 normalmente puede lograr al menos un 50 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, normalmente aproximadamente de 7 a 21 días después del día 0, en particular aproximadamente 14 días después del día 0, y/o normalmente puede mantener al menos un 90 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, durante un período de hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0 (como se describió anteriormente, "día 0" como se hace referencia en la presente memoria es el día en que se inicia la dosificación de un compuesto de la invención a un paciente y, como tal, indica el tiempo posterior a la dosis);

- ETX021 normalmente puede lograr al menos un 40 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, normalmente aproximadamente de 7 a 21 días después del día 0, en particular aproximadamente 14 días después del día 0, y/o normalmente puede mantener al menos 80 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, durante un período de hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0 (como se describió anteriormente, "día 0" como se hace referencia en la presente memoria es el día en que se inicia la dosificación de un compuesto de la invención a un paciente y, como tal, indica el tiempo posterior a la dosis);

- ETX023 normalmente puede lograr al menos un 20 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, normalmente a aproximadamente 7 a 21 días después del día 0, en particular a aproximadamente 14 días después del día 0, y/o normalmente puede mantener al menos el 50 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, durante un período de hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0 (como se describió anteriormente, "día 0" como se hace referencia en la presente memoria es el día en que se inicia la dosificación de un compuesto de la invención a un paciente y, como tal, indica el tiempo posterior a la dosis);

- ETX025 normalmente puede lograr al menos un 50 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, normalmente aproximadamente de 7 a 21 días después del día 0, en particular a aproximadamente 14 días después del día 0, y/o normalmente puede mantener al menos 70 % de disminución del nivel de proteína sérica de una proteína objetivo, normalmente TTR, durante un período de hasta al menos aproximadamente 84 días después del día 0 (como se describió anteriormente, "día 0" como se hace referencia en la presente memoria es el día en que se inicia la dosificación de un compuesto de la invención a un paciente y como tal denota el tiempo posterior a la dosis). De manera adecuada, la disminución del nivel sérico se determina en primates no humanos administrando una dosis subcutánea única de 1 mg/kg del agente activo relevante, p. ej. ETX0023, disuelto en disolución salina (cloruro sódico estéril al 0,9 %). En la presente memoria se describen métodos adecuados. Se apreciará que esto no es limitante y que se pueden usar otros métodos adecuados con controles apropiados.

Ejemplo 5 ETX023 (dirigido a ARNm de TTR) T1a abásico invertido

Los niveles de bilirrubina total se mantuvieron estables durante todo el estudio (FIG. 22)

La salud de los riñones se monitorizó mediante la evaluación de la concentración de urea (nitrógeno ureico en sangre, BUN) y creatinina durante todo el estudio. Tanto la concentración de urea en sangre (BUN) como los niveles de creatinina permanecieron estables y dentro del intervalo esperado después de una dosis única de 1 mg/kg de ETX023 (FIG. 23 y 24).

Un aspecto adicional de la invención se describe a continuación, con ejemplos no limitantes descritos en las siguientes Figuras 25-27 y Ejemplos 6-15. Los compuestos descritos a continuación son adecuados para su uso en cualquiera de los aspectos y realizaciones descritas anteriormente, por ejemplo con respecto a los usos, longitudes de ácidos nucleicos, definiciones, composiciones farmacéuticamente aceptables, dosificación, métodos para inhibir la expresión génica y métodos para tratar o prevenir enfermedades asociadas con la expresión génica como se describe en la presente memoria y que no forman parte de la invención, a menos que lo contrario se desprenda inmediatamente de la descripción.

La FIG. 25A representa una unidad de GalNAc (*N*-acetilgalactosamina) triantenaria

La FIG. 25B representa una GalNAc triantenaria alternativa según una realización de la invención, que muestra una variación en los grupos de enlace.

La FIG. 26A representa ARNip conjugado con GalNAc triantenario según la invención, que muestra variación en los grupos de unión.

La FIG. 26B representa un género de ARNip conjugado con GalNAc triantenario según una realización de la invención.

La FIG. 26C representa un género de ARNip conjugados con GalNAc biantenario según una realización de la invención, que muestra variación en los grupos de unión.

La FIG. 26D representa un género de ARNip conjugados con GalNAc biantenarios según otra realización de la invención, que muestra variación en los grupos de unión.

La FIG. 27A representa otra realización del ARNip conjugado con GalNAc triantenario según una realización de la descripción.

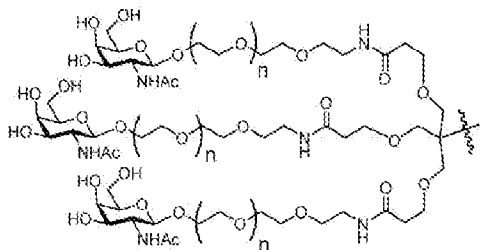
FIG. 27B representa una variante mostrada en la Fig. 27A, que tiene un conjugado de GalNAc ramificado alternativo.

La FIG. 27C representa un género de ARNip conjugados con GalNAc triantenarios según una realización de la descripción, que muestra variación en los grupos de unión.

La FIG. 27D representa un género de ARNip conjugados con GalNAc biantenarios según una realización de la descripción, que muestra variación en los grupos de unión.

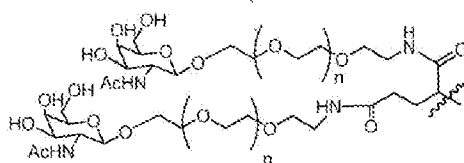
El aspecto adicional describe formas de agentes de ARNi químicamente modificados, conjugados con ligando de ASGP-R, y métodos de elaboración y usos de dichas moléculas conjugadas.

En determinadas realizaciones, el ligando ASGP-R comprende *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). En determinadas realizaciones, la invención proporciona un ARNip conjugado con unidades triantenarias o biantenarias de GalNAc de la siguiente fórmula (I):



Fórmula I*

En la Fórmula I*, *n* es 0, 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, el número de unidades de etilenglicol puede variar independientemente entre sí en las diferentes ramificaciones. Por ejemplo, la ramificación intermedia puede tener *n*=4, mientras que las ramificaciones laterales pueden tener *n*=3, etc. Otras realizaciones pueden contener sólo dos ramificaciones, como se representa en las Fórmulas (II-a).



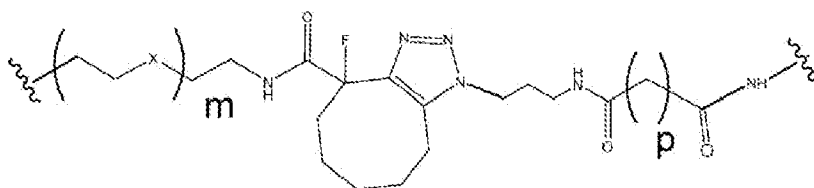
Fórmula II* - a

En las Fórmulas II* y II*-a, n se elige de 0, 1, 2, 3 o 4. En algunas realizaciones, el número de unidades de etilenglicol puede variar independientemente entre sí en las diferentes ramificaciones. Por ejemplo, una ramificación puede tener n=4 o 3, mientras que las otras ramificaciones pueden tener n=3 o 2, etc.

- 5 También se pueden agregar ramificaciones de GalNAc adicionales, por ejemplo, se pueden usar unidades de GalNAc de 4, 5, 6, 7, 8, 9 ramificaciones.

En realizaciones relacionadas, la GalNAc ramificada puede modificarse químicamente mediante la adición de otro resto de direccionamiento, por ejemplo, unos lípidos, colesterol, un esteroide, un ácido biliar, (poli)péptido de direccionamiento, incluidos polipéptidos y proteínas (p. ej., péptido RGD, transferrina, poliglutamato, poliaspartato, péptido glicosilado, biotina, asialoglicoproteína insulina y EGF).

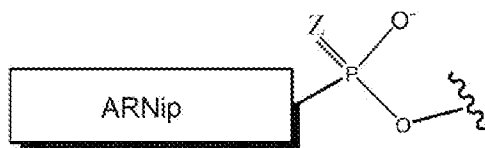
Opción 1. En realizaciones adicionales, las unidades de GalNAc se pueden unir al agente de ARNi mediante una unión, como la que se muestra en la Fórmula (III*):



Fórmula III*

- 15 En la Fórmula III*, m se elige de 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y p se elige de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14, independientemente de m, y X es CH₂ u O.

En otras realizaciones más, la unión puede unirse al oligo mediante fosfato (Z=O) o un grupo fosforotioato (Z=S), como se muestra en la fórmula (IV*):



Fórmula IV*

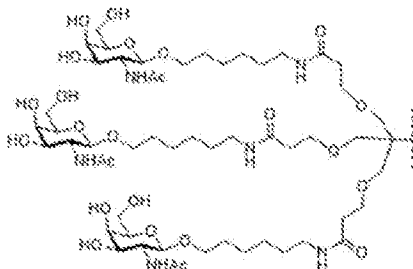
- 20 Dicha unión de las unidades ramificadas de GalNAc a través de las uniones especificadas es preferiblemente en un extremo 3' o 5' de la hebra sentido del agente de ARNi. En una realización, la unión al 3' del agente de ARNi es a través del conector amino C6 como se muestra en la Fórmula (V*):



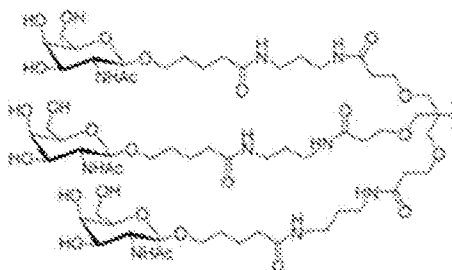
Fórmula V*

Este conector es el punto de partida de la síntesis como se muestra en el Ejemplo 12.

Se pueden usar los mismos conectores y uniones que se describen anteriormente con estructuras de GalNAc ramificadas alternativas como se muestra en las Fórmulas VI* y VII*:



Fórmula VI*

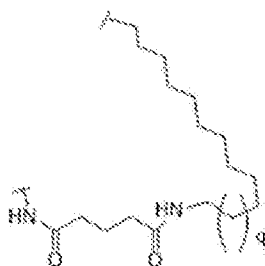


Fórmula VII*

5

De manera similar a la Fórmula II*-a, se puede usar en las composiciones de la descripción una forma biantenaria de ligando basada en las Fórmulas VI* y VII*.

Opción 2. En realizaciones adicionales, las unidades GalNAc se pueden unir al agente de ARNi mediante una unión, tal como la que se muestra en la Fórmula (III*-2):

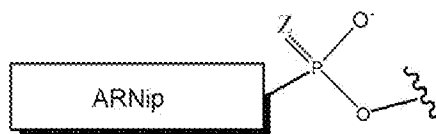


Fórmula III*-2

10

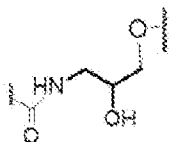
En la Fórmula III*-2, q se elige de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

En aún otras realizaciones, la unión puede unirse al oligo mediante fosfato ($Z=O$) o un grupo fosforotioato ($Z=S$), como se muestra en la fórmula (IV*):



Fórmula IV*

- 5 Dicha unión de las unidades ramificadas de GalNAc a través de las uniones especificadas preferiblemente en un extremo 3' o 5' de la hebra sentido del agente de ARNi bicatenario. En una realización, la unión a 3' del agente de ARNi es como se muestra en el Ejemplo 14. En una realización, cuando la unión de GalNAc está unida al sitio 3', el conector de transición entre la unión y el extremo 3' del oligo comprende la estructura de la fórmula (V*-a; véase también la Fig. 27C) o se puede usar otro conector adecuado, por ejemplo, el conector amino C6 mostrado en la Fórmula (V*-b):



Fórmula V*-a

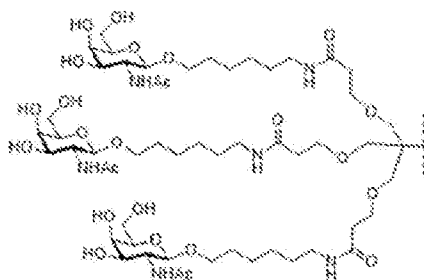
10



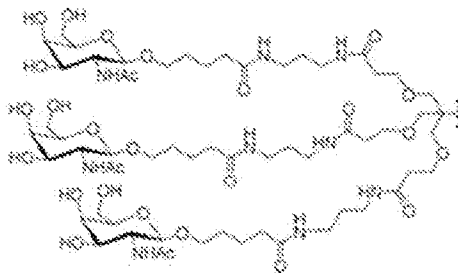
Fórmula V*-b

Los sitios de conjugación adicionales y/o alternativos pueden incluir cualquier nucleótido no terminal, incluidos residuos de azúcar, grupos fosfato o bases de ácidos nucleicos.

- 15 Se pueden usar los mismos conectores y uniones con estructuras de GalNAc ramificadas alternativas como se muestra en las Fórmulas VI*-2 y VII*-2:



Fórmula VI*-2



Fórmula VII*-2

Características de los agentes de ARNi de la invención y sus modificaciones químicas

En determinadas realizaciones, el compuesto oligomérico conjugado (denominado en la presente memoria como compuesto de interferencia de ARN (compuesto de ARNi)) comprende dos hebras, cada una de las cuales tiene una secuencia de 8 a 55 subunidades de monómero de nucleótidos unidas (incluido(s) nucleótido(s) abásico(s) invertido(s) (ia)) en la hebra antisentido o en la hebra sentido. En determinadas realizaciones, las hebras del compuesto oligomérico conjugado comprenden, por ejemplo, una secuencia de 16 a 55, 53, 49, 40, 25, 24, 23, 21, 20, 19, 18, 17 o hasta (aproximadamente) 18-25, 18-23, 21-23 subunidades de monómero de nucleótido unidas. En ciertas realizaciones, el agente de ARNi de la invención puede tener una estructura en horquilla, que tiene una sola hebra de las longitudes combinadas de ambas hebras como se describió anteriormente. (El término "nucleótido", como se usa a lo largo de la memoria, también puede referirse a nucleósidos (es decir, nucleótidos sin grupos fosfato/fosfonotioato) cuando el contexto así lo requiera.)

En determinadas realizaciones, el agente de ARNi bicatenario tiene extremos romos o tiene un saliente en uno o ambos extremos. En algunas realizaciones, el saliente es 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 2-4, 4, 3, 2 o 1 nucleótido(s) (en el extremo 3' o en el extremo 5') de la hebra antisentido así como 2-4, 3, o 2 o 1 nucleótido(s) (en el extremo 3' o en el extremo 5') de la hebra sentido. En determinadas realizaciones ejemplares, véase el Ej. 6, constructos 6.1, 6.2 y 6.3, el agente de ARNi comprende un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido y un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la hebra sentido. En ciertas otras realizaciones ejemplares, véase el Ej. 7, constructos 7.1 y 7.3, Ej. 8, constructos 8.1 y 8.3; y Ej. 9, constructos 9.1 y 9.3, los agentes de ARNi comprenden un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido y tienen extremos romos en el otro extremo. En cierta realización ejemplar distinta, véase el Ej. 7, constructo 7.3, el constructo tiene extremos romos en ambos extremos. En otra realización ejemplar, véase Ej. 9, constructo 9.2, el agente de ARNi comprende un saliente de 4 nucleótidos en el extremo 3' de la hebra antisentido y un extremo romo en el otro extremo.

En determinadas realizaciones, los constructos se modifican con un resto protector de la degradación que previene o inhibe la escisión de nucleasa mediante el uso de una caperuza terminal, uno o más nucleótidos abásicos invertidos, uno o más enlaces fosforotioato, uno o más desoxinucleótidos (p. ej., D-ribonucleótido, D-2'-desoxirribonucleótido u otro nucleótido modificado), o una combinación de los mismos. Dichos restos protectores de la degradación pueden estar presentes en uno cualquiera o en todos los extremos que no están conjugados con el ligando ASGP-R. En determinadas realizaciones, el resto protector de la degradación se elige solo o como cualquier combinación de un grupo que consiste en 1-4, 1-3, 1-2 o 1 enlaces fosforotioato, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 desoxinucleótidos, y 1-4, 1-3, 1-2 o 1 nucleótidos abásicos invertidos. En ciertas realizaciones ejemplares, los restos protectores de la degradación están configurados como en uno de los constructos 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2 y 9.3, como se muestra en los Ejemplos 6-15. Estas configuraciones de restos protectores ejemplares se pueden usar junto con cualquier agente de ARNi de la invención.

En determinadas realizaciones, se modifican todas o algunas ribosas de los nucleótidos en la(s) hebra(s) sentido y/o antisentido. En determinadas realizaciones, se modifican al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o más (p. ej., 100 %) de las ribosas en el agente de ARNi. En determinadas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más ribosas no están modificadas.

En realizaciones preferidas, las modificaciones de ribosa incluyen grupos sustituyentes 2' tales como modificaciones 2'-O-alquilo, que incluyen 2'-O-metilo y 2'-desoxifluoro. Se conocen modificaciones adicionales en la técnica, que incluyen 2'-desoxi, LNA (p. ej., puente de metileno 2'-O,4'-C o puente de etileno 2'-O,4'-C), 2'-metoxietoxi (MOE), 2'-O-(CH₂)OCH₃, etc.

En determinadas realizaciones, una serie de modificaciones proporcionan un patrón distinto de modificaciones, por ejemplo, como se muestra en constructos en los Ejemplos 6-15, o como se describe en las patentes de EE.UU. núms. 7.452.987; 7.528.188; 8.273.866; 9.150.606; y 10.266.825.

En algunas realizaciones, el ARNi comprende uno o más nucleótidos térmicamente desestabilizadores, p. ej., GNA, ENA, etc., por ejemplo, en las posiciones 11 (preferida), 12, 13 de la hebra antisentido y/o en las posiciones 9 y 10 (preferida) de la hebra sentido.

Además, las bases de ácidos nucleicos podrían modificarse, por ejemplo, en la posición C4 como se describe en la patente de EE.UU. núm. 10.119.136.

En general, los agentes de ARNi de la invención están dirigidos contra objetivos terapéuticos, cuya inhibición dará como resultado la prevención, el alivio o el tratamiento de una enfermedad, incluidas condiciones patológicas o indeseables. En la técnica se conoce un gran número de dichos objetivos. Ejemplos no limitantes de dichos objetivos incluyen: ApoC, ApoB, ALAS1, TTR, GO, C5 (véase Ejemplos), etc. Generalmente, debido a la abundante expresión de ASGP-R en la superficie de los hepatocitos, dichos objetivos se expresan preferiblemente en el hígado, sin embargo, también podrían expresarse en otros tejidos u órganos. En realizaciones preferidas, los objetivos son seres humanos, aunque el agente de ARNi comprende una hebra antisentido total o parcialmente complementaria a dicho objetivo. En determinadas realizaciones, los agentes ARNi pueden comprender dos o más agentes de ARNi unidos químicamente dirigidos contra objetivos iguales o diferentes.

15 Ejemplos

Ejemplo 6: Química abásica invertida con 5'-GalNAc

En todos los agentes de ARNi representados en los Ejemplos, se usan las siguientes convenciones:

ia = nucleótido abásico invertido;

m = 2'-O-metilnucleótido;

20 f = 2'-desoxi-2'-fluoronucleótido;

s = enlace internucleotídico de fosforotioato;

Xd = 2'-desoxinucleótido;

~ = unión.

Usando técnicas de síntesis estándar, se sintetizan los siguientes constructos en varias versiones, con las uniones 1 y 2, y con varias unidades de GalNAc triantenarias, como se describió anteriormente o se representa en las Figuras 26A-27B.

6.1

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:1; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:2)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3'

3' AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

30 6.2

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:3; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:4)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' GalNAc~Am-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3'

3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'

25 25 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

6.3

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:5; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:6)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' GalNAc~Um-Gm-Gm-Gm-Am-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3'

3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Ejemplo 7: Química abásica invertida con 3'-GalNAc

Usando técnicas de síntesis estándar, se sintetizan los siguientes constructos en varias versiones, con las uniones 1 y 2 según la descripción, y con varias unidades de GalNAc triantenarias, como se describió anteriormente o se representa en las Figuras 26A-27B. Se muestran las mismas secuencias que en el Ejemplo 6 para mantener la coherencia.

7.1

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:7; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:8)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' ia-ia-GmsAmsCm-Um-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Am-Um-Am-Um-Am~GalNAc 3'

3' AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

7.2

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:9; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:10)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am~GalNAc 3'

3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'

25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

7.3.

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:11; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:12)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23

5' ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am~GalNAc 3'

3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Ejemplo 8: Química abásica invertida con 5'-GalNAc con patrones de modificación alternativos

Usando técnicas de síntesis estándar, se sintetizan los siguientes constructos en varias versiones, con las uniones 1 y 2 según la descripción, y con varias unidades de GalNAc triantenarias, como se describió anteriormente o se representa en las Figuras 26A-27B. Aquí se muestran las mismas secuencias que en el Ejemplo 6 para mantener la coherencia.

8.1.

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:13; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:14)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5' GalNAc~Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3'
3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'
23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

8.2

5 (Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:15; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:16)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5' GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3'
3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'
25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

8.3.

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:17; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:18)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5' GalNAc~Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-AfsGmsAf 3'
3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'
23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

10 Ejemplo 9: Química abásica invertida con 5'-GalNAc con patrones de modificación alternativos

Usando técnicas de síntesis estándar, se sintetizan los siguientes constructos en varias versiones, con las uniones 1 y 2 según la descripción, y con varias unidades de GalNAc triantenarias, como se describió anteriormente o se representa en las Figuras 26A-27B. Se muestran las mismas secuencias que en el Ejemplo 6 para mantener la coherencia.

15 9.1

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:19; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:20)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5' GfsAmsCf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Af~GalNAc 3'
3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'
23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

9.2

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:21; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:22)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
5' AfsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-Af-Um-Af~GalNAc 3'
3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'
25 24 23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

20

9.3

(Hebra superior (sentido (ss)): SEQ ID NO:23; hebra inferior (antisentido) SEQ ID NO:24)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21

5' UfsGmsGf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af-GalNAc 3'

3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'

23 22 21 20 19 18 17 16 15 14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

Ejemplo 10: Comparativa de conjugados de ARNip-GalNAc

- 5 Los constructos usados en los Ejemplos 6-15 se denominan por sus números y se enumeran en la Tabla 12. La unión 1 y la unión 2 se muestran en las figuras 26 y 27 respectivamente.

Tabla 12

Constructo	Objetivo A (GO)	Objetivo B (C5)	Objetivo C (TTR)
Unión 1	6.1	6.2	6.3
Unión 2	6.1	6.2	6.3
Unión 1	8.1	8.2	8.3
Unión 2	8.1	8.2	8.3
Unión 1	7.1	7.2	7.3
Unión 2	7.1	7.2	7.3
Unión 1	9.1	9.2	9.3
Unión 2	9.1	9.2	9.3
Control 3'-GalNAc (p. ej., véase la Fig. 25A)			

- 10 La siguiente Tabla 13 refleja la comparativa que se realizará con varios constructos seleccionados de la invención y la descripción.

Tabla 13. Experimentos in vitro para la comparativa de ARNip-GaINAc

Objetivo	Agentes de RNAi comparativos	A		B		C	
		Absorción en hepatocitos primarios humanos	Unión a ASPGR de hepatocitos humanos	Absorción en hepatocitos primarios humanos	Unión a ASPGR de hepatocitos humanos	Absorción en hepatocitos primarios humanos	Unión a ASPGR de hepatocitos humanos
1	opción de unión 1 en el extremo 5' de la hebra sentido	Incubaciones de 0, 4 y 24 h (actualización), (silenciamiento), o transfección de Hep3B con RNAiMax durante 24 h	Determinar KD para la unión de ASPGR con ARNip-GaINAc	Incubaciones de 0, 4 y 24 h (actualización), (silenciamiento), o transfección de Hep3B con RNAiMax durante 24 h	Determinar KD para la unión de ASPGR con ARNip-GaINAc	Incubaciones de 0, 4 y 24 h (actualización), (silenciamiento), o transfección de Hep3B con RNAiMax durante 24 h	Determinar KD para la unión de ASPGR con GaINAc
	química abásica invertida						
2	opción de unión 2 en el extremo 5' de la hebra sentido						
	química abásica invertida						
3	opción de unión 1 en el extremo 5' de la hebra sentido						
	química alterna						
4	opción de unión 2 en –el extremo 5' de la hebra sentido						
	Química alterna						
5	opción de unión 1 en el extremo 3' de la hebra sentido						
	química abásica invertida						
6	opción de unión 2 en el extremo 3' de la hebra sentido						
	química abásica invertida						

7	opción de unión 1 en el extremo 3' de la hebra sentido						
	química alterna						
8	opción de unión 2 en el extremo 3' de la hebra sentido						
	química alterna						
9	Control 3'-GalNAc (p. ej., véase la Fig. 25A)						

Caracterización farmacodinámica *in vitro*

La actividad farmacodinámica *in vitro*, la afinidad de unión y la absorción hepática para 8 constructos, enumerados en la Tabla 12 (análogos de RNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR) se comparan con las versiones clínicamente validadas de estas moléculas.

- 5 Ensayo de transfección de la línea celular hepática humana (HepG2 o Hep3B): cada molécula análoga de ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR se incuba a 37 °C durante 0 y 24 horas a 10 concentraciones diferentes en línea celular hepática humana en presencia de reactivo de transfección (p. ej., RNAiMAX). Todas las incubaciones en cada concentración se realizan por cuadruplicado. Después de las incubaciones, cada muestra se lisa y se analiza para determinar las concentraciones de ARNm de HAO1 C5, TTR y del gen constitutivo (tal como GAPDH) mediante un ensayo de ADNb o RT-qPCR. Los datos de concentraciones de ARNm obtenidos se usan para el análisis para determinar la actividad silenciadora y la CI_{50} para cada una de las moléculas ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR.

- 15 Ensayo de absorción de hepatocitos humanos primarios: La absorción hepática y la actividad silenciadora de cada una de las moléculas ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR se evalúan en hepatocitos humanos primarios. Cada molécula de análogos de ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR se incuba a 37 °C durante 0, 4 y 72 horas a 10 concentraciones diferentes en hepatocitos humanos primarios. Todas las incubaciones en cada concentración se realizan por cuadruplicado. Después de las incubaciones, cada muestra se lisa y se analiza para determinar las concentraciones de ARNm de HAO1, C5, TTR y gen(es) constitutivo(s) (tal como GAPDH) mediante un ensayo de ADNb o RT-qPCR. Los datos de concentraciones de ARNm obtenidos se usan para análisis para determinar la actividad silenciadora, la absorción y la CI_{50} para cada una de las moléculas ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR.

Caracterización farmacodinámica *in vivo*

- 25 La actividad farmacodinámica *in vivo* de 8 constructos de cada uno de los análogos de ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR se compara con la actividad farmacodinámica *in vivo* de cada molécula de ARNip-GalNAc de GO1, ARNip-GalNAc de C5 y ARNip-GalNAc de TTR clínicamente validada después de una única administración subcutánea a ratones macho o monos cynomolgus.

- 30 Para la farmacología en ratones *in vivo* de ARNip-GalNAc de GO1 de cada uno de los análogos se evalúa después de una dosis subcutánea única de 0,3 o 3 mg/kg como se proporciona en la Tabla 14 a continuación. Hay 2 grupos de dosis en donde cada uno de los análogos de ARNip-GalNAc de GO1 se administra por vía subcutánea a ratones macho C57BL/6 (n=3/punto temporal/grupo) a 0,3 o 1 mg/kg. Se obtienen muestras de sangre para obtener muestras de suero y muestras de biopsia de hígado en varios puntos temporales para determinar la concentración de glicolato sérico mediante LCMS y para determinar la concentración de ARNm de HAO1 mediante RT-qPCR o ensayo de ADNb. Los animales de cada grupo en cada punto temporal especificado se sacrifican y se recogen sangre (aproximadamente 0,5 ml/animal) e hígado (aproximadamente 100 mg). Para los grupos 1 a 9, se recoge sangre (aproximadamente 0,5 ml/animal) e hígado (aproximadamente 100 mg) de 3 animales/punto temporal/grupo a las 24, 48, 96, 168, 336, 504 y 672 horas después de la dosificación. El grupo 10 (n=3) es un grupo de control al que no se le dosifica para proporcionar valores iniciales para las concentraciones séricas de glicolato y ARNm de HAO1. El efecto farmacodinámico del aumento del glicolato sérico y el silenciamiento del ARNm de HAO1 en el hígado en varios puntos temporales posteriores a la dosificación se compara con las muestras de hígado y suero de control del Grupo 10.

- 40 Tabla 14. Diseño de estudio de farmacología en ratones de análogos de ARNip-GalNAc de GO1

Grupo	Número de animales	Ruta de dosis	Número de dosis/animal	Nivel de dosis objetivo (mg/kg)	Concentración de dosis objetivo (mg/ml)	Volumen de dosis objetivo (mL/kg)
	Machos					
1	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
2	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
3	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
4	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
5	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
6	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
7	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
8	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
9	21	SC	1	0,3 o 3	3	1,5
10 ^a	5	NA	NA	NA	NA	NA

Leyenda de la tabla:

SC

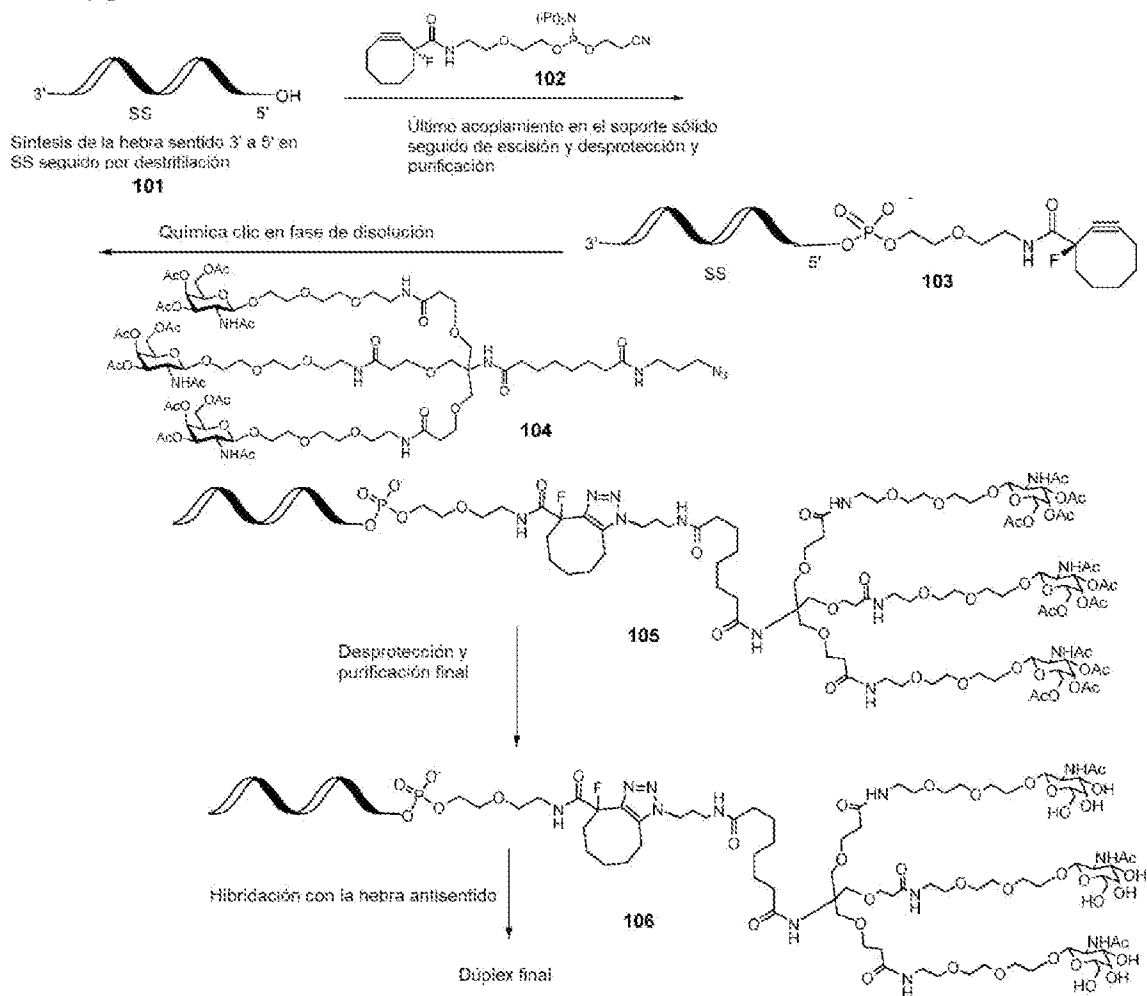
NA No aplica

a Los animales del grupo 10 son animales de control y no están dosificados

c Los animales de los grupos 1 a 9 se dosifican el día 1

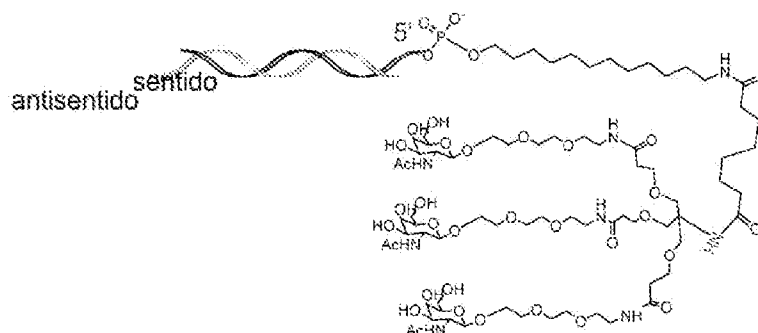
Ejemplo 11: Conjugación 5' usando química clic (Opción 1)

Opción 1 de conjugación en 5'



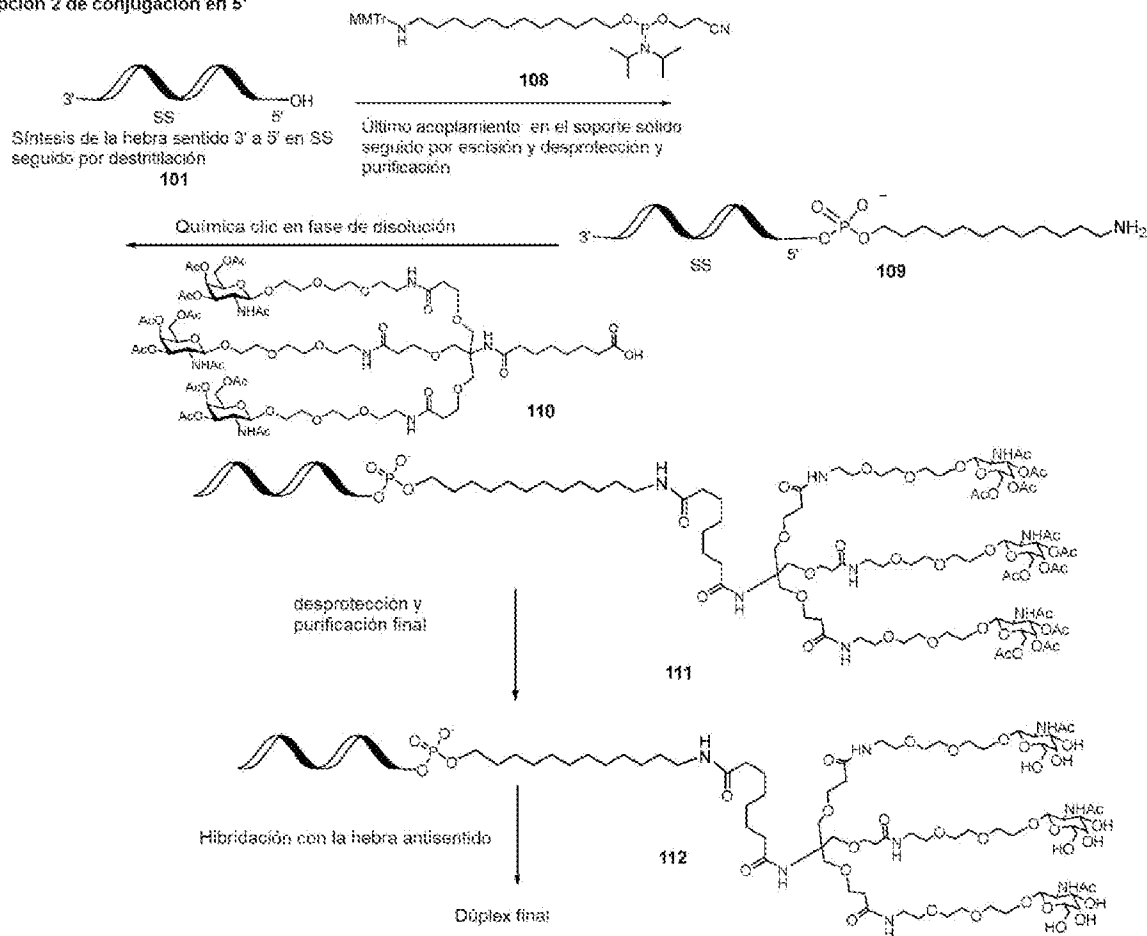
- 5 En esta realización, la hebra sentido del oligonucleótido 101 se sintetiza sobre un soporte sólido y se acopla con la octino-amidita 102 disponible comercialmente para dar el oligonucleótido requerido con el precursor de la química clic sobre el soporte sólido. Esto, después de la escisión y desprotección estándar, proporciona el oligonucleótido 103 puro. La azida 104 se disuelve en DMSO (150 µl/mg) y esta disolución se añade a 10 OD de oligo 103 en 100 µL de agua. Luego se incubó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante la noche. El oligo 105 conjugado se desaliniza en un Glen Gel-Pak™ para eliminar compuestos orgánicos y los grupos protectores acetoxi se eliminaron mediante tratamiento con metilamina seguido de HPLC preparativa para dar Oligo 106 puro que se hibrida con una cantidad equimolar de hebra sentido para dar el dúplex final.
- 10

Ejemplo 12: Conjugación 5' (Opción 2)

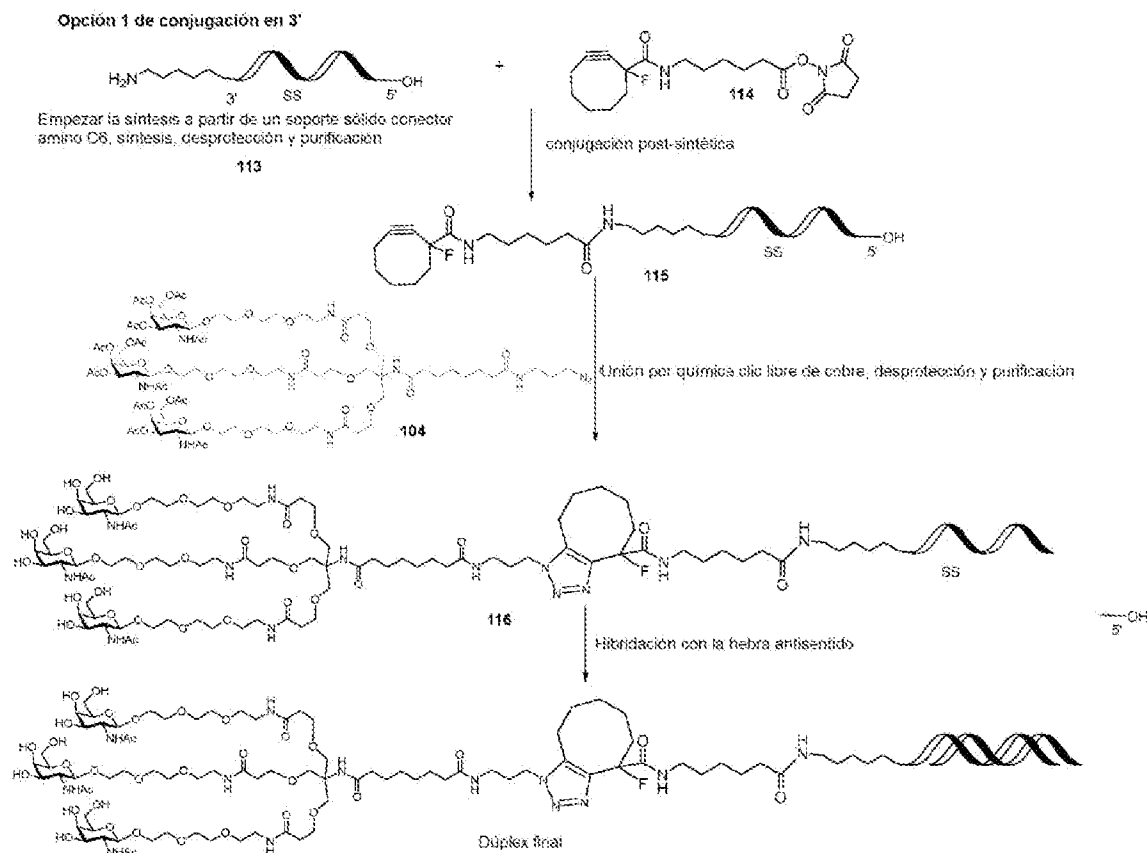


En esta realización, la hebra sentido del oligonucleótido 101 se sintetiza sobre un soporte sólido y se acopla con la amidita 108 disponible comercialmente para dar el oligonucleótido requerido sobre el soporte sólido. Esto, después de la escisión y desprotección estándar, proporciona el oligonucleótido 109 puro. La amina 109 se disuelve en agua (15 $\mu\text{L}/\text{OD}$) y esta disolución se añade a una disolución del ácido 110 en DMSO (100 ml/mg) seguido de 10 equivalentes molares de EDC y 10 equivalentes de HOBT y la mezcla de reacción se incuba a temperatura ambiente durante la noche. El oligo 111 conjugado se desaliniz después en un Glen Gel-Pak™ para eliminar los compuestos orgánicos y los grupos protectores acetoxi se eliminaron mediante tratamiento con metilamina seguido de HPLC preparativa para dar Oligo 112 puro que se hibrida con una cantidad equimolar de hebra sentido para dar el dúplex final.

Opción 2 de conjugación en 5'

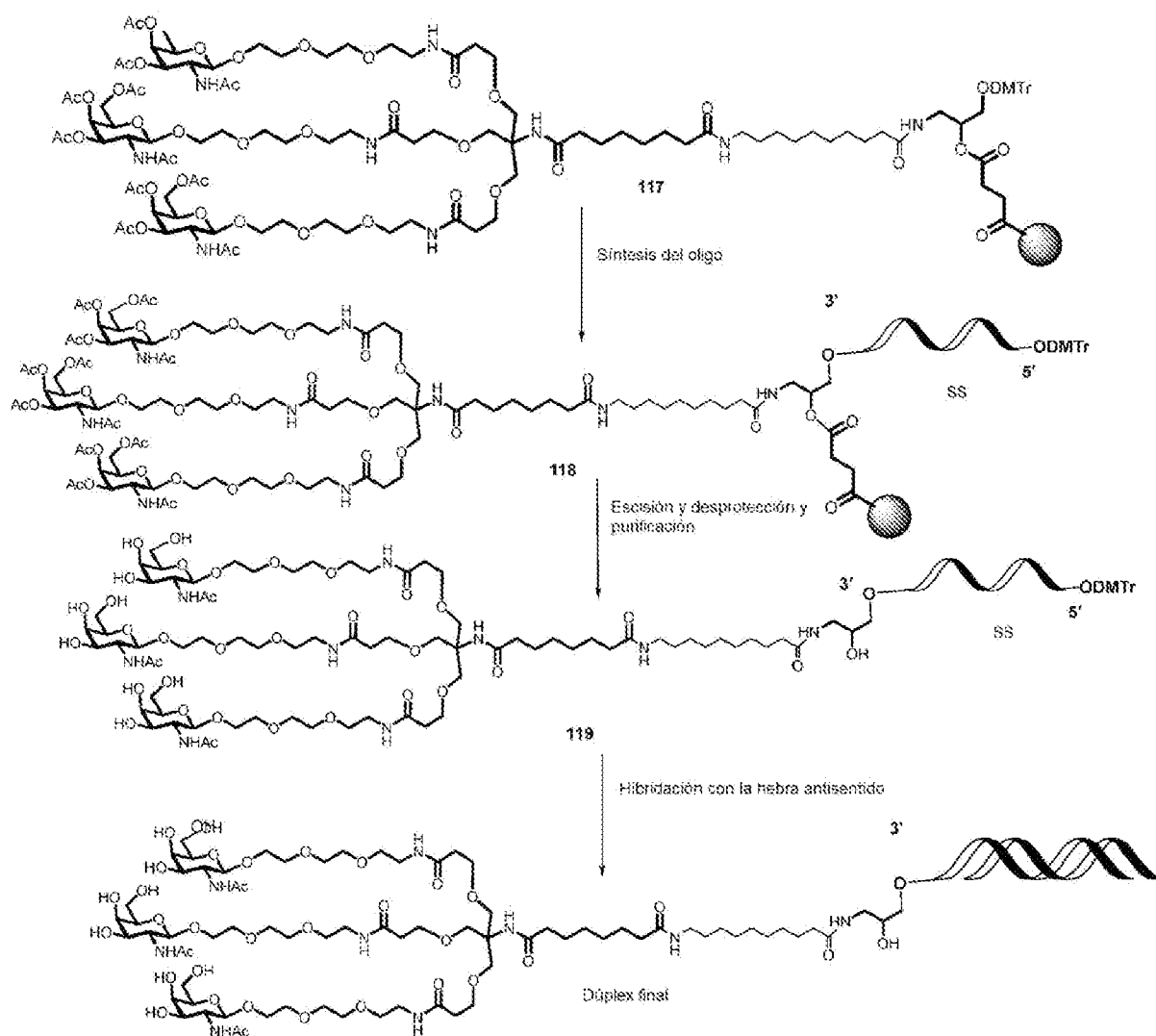


Ejemplo 13: Conjugación 5' usando química clic (Opción 1)



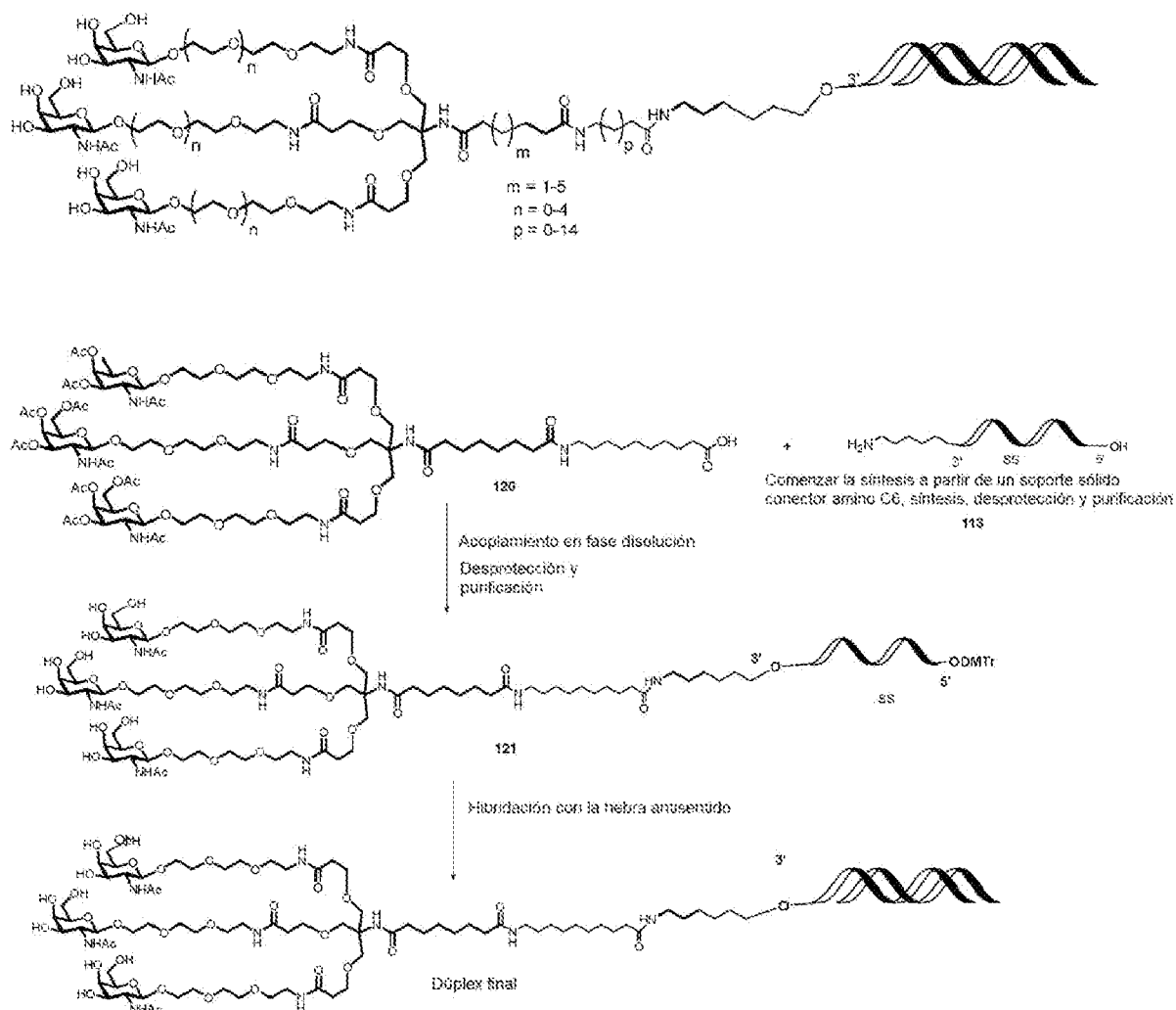
Para la síntesis de constructo oligo 119 se adapta un enfoque similar donde el conjugado de GalNAc triantenario se carga en el soporte sólido 118 (CPG) y se realiza la síntesis de oligo. Después de la escisión y desprotección y purificación se proporciona el oligo 119 puro que se hibrida con una hebra antisentido para dar el dúplex final requerido en forma pura. En otro enfoque, el conjugado 3' también se sintetiza de forma análoga a la síntesis de 116 a partir de oligo 113 unido a amino y conjugando postsintéticamente el ácido carboxílico GalNAc para dar el oligo 119 conjugado.

Ejemplo 14: Conjugación 3' (Opción 2)



Para la síntesis del constructo oligo 119 se adapta un enfoque similar donde el conjugado de GalNAc triantenario se carga sobre el soporte sólido 118 (CPG) y se realiza la síntesis de oligo. Después la escisión, desprotección y purificación proporcionó el oligo 119 puro que se hibrida con una hebra antisentido para dar el dúplex final requerido en forma pura. En otro enfoque, el conjugado 3' también se sintetiza de forma análoga a la síntesis de 116 a partir de oligo 113 unido a amino y conjugando postsintéticamente el ácido carboxílico GalNAc para dar el oligo 119 conjugado.

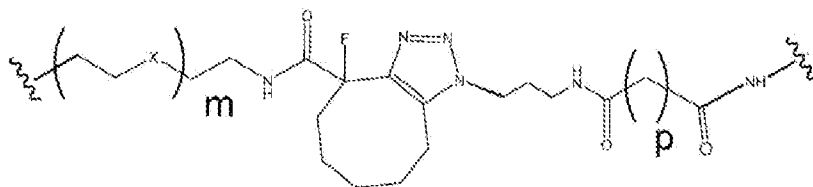
Ejemplo 15: Enfoque de conjugación postsintética



En este enfoque, el conjugado 3' también se sintetiza de forma análoga a la síntesis de 116 a partir de oligo 113 unido a amino y conjugando postsintéticamente el ácido carboxílico GalNAc para dar el oligo 121 conjugado que se hibrida con una hebra antisentido para dar el dúplex final requerido en forma pura.

Enunciados

1. Un agente de ARNi modificado que comprende un compuesto de interferencia de ARN (compuesto de ARNi) conjugado mediante una unión con un ligando de ASGP-R, en donde la unión comprende:



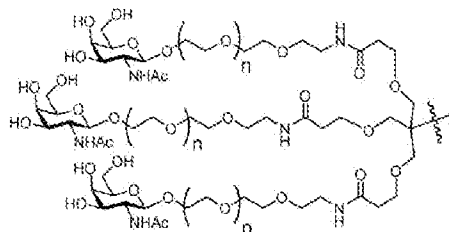
(Fórmula III*)

10 en donde m se elige de 0, 1, 2, 3, 4 o 5, y p se elige de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14, independientemente de m; y X se elige de O y CH₂.

2. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, en donde m=1.

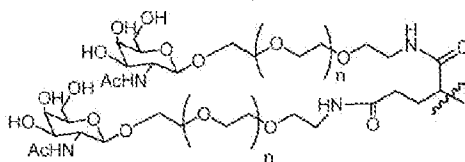
3. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, en donde x es O.

4. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, en donde $p=6$.
5. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, en donde $m = 1$, $p = 6$ y x es O.
6. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, en donde el ligando de ASGP-R comprende una GalNAc ramificada.
7. El agente de ARNi modificado del enunciado 6, en donde la GalNAc ramificada se selecciona del grupo que consiste en:



Fórmula I*

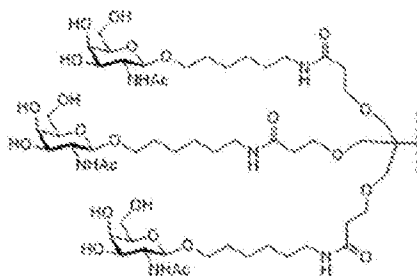
y



Fórmula II* - a

en donde n es 0, 1, 2, 3 o 4.

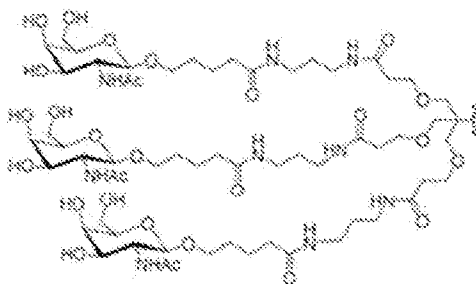
8. El agente de ARNi modificado del enunciado 7, en donde $n=1$.
9. El agente de ARNi modificado del enunciado 6, en donde la GalNAc ramificada comprende



Fórmula VI*

o una forma biantenaria del mismo.

10. El agente de ARNi modificado del enunciado 6, en donde la GalNAc ramificada comprende o una forma biantenaria de la misma.

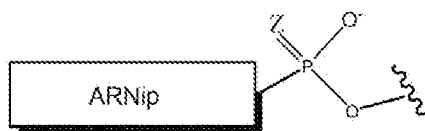


Fórmula VII*

o una forma biantenaria del mismo.

5 11. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, en donde la unión está unida al extremo 5' de la hebra sentido.

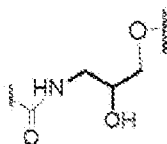
12. El agente de ARNi modificado del enunciado 11, en donde la unión está unida como se muestra en la Fórmula IV*.



en donde Z es P o S.

13. El agente de ARNi modificado del enunciado 11, en donde la unión está unida al extremo 3' de la hebra sentido.

10 14. El agente de ARNi modificado del enunciado 13, en donde la unión está unida como se muestra en las Fórmulas V*-a o V*-b:



Fórmula V*-a



Fórmula V*-b

15. El agente de ARNi modificado del enunciado 1, como se muestra en las Figs. 26A, 26B, 26C o 26D.

15 16. El agente de ARNi modificado del enunciado 15, en donde el compuesto de ARNi comprende ribosas modificadas que están modificadas en la posición 2'.

17. El agente de ARNi modificado del enunciado 16, en donde las modificaciones se eligen de 2'-O-metilo, 2'-desoxi-fluoro y 2'-desoxi.

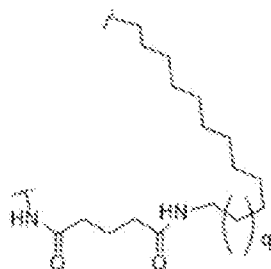
20 18. El agente de ARNi modificado de la afirmación 1, en donde el compuesto de ARNi contiene uno o más restos protectores de la degradación en cualquiera o todos los extremos que no están conjugados con el ligando ASGP-R.

19. El agente de ARNi modificado del enunciado 18, en donde el resto protector de la degradación se elige solo o

como cualquier combinación de un grupo que consiste en 1-4 enlaces fosforotioato, 1-4 desoxinucleótidos y 1-4 nucleótidos abásicos invertidos.

20. El agente de ARNi modificado del enunciado 19, en donde los restos protectores de la degradación se eligen de la configuración presente en uno de los siguientes constructos 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2. y 9.3.

- 5 21. Un agente de ARNi modificado que comprende un compuesto de interferencia de ARN (compuesto de ARNi) conjugado mediante una unión con un ligando de ASGP-R, en donde la unión comprende:



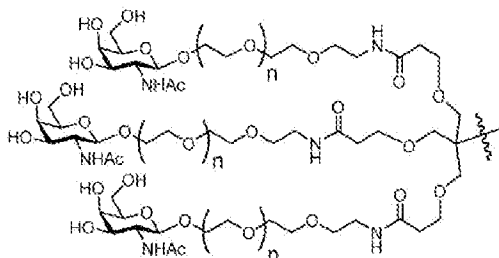
(Fórmula III*-2)

en donde q se elige de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

22. El agente de ARNi modificado del enunciado 21, en donde q=1.

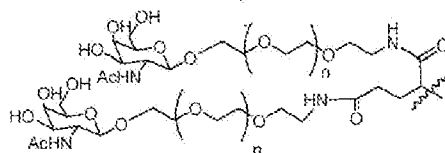
- 10 23. El agente de ARNi modificado del enunciado 21, en donde el ligando de ASGP-R comprende una GalNAc ramificada.

24. El agente de ARNi modificado del enunciado 23, en donde la GalNAc ramificada se selecciona del grupo que consiste en:



Fórmula I*

- 15 y

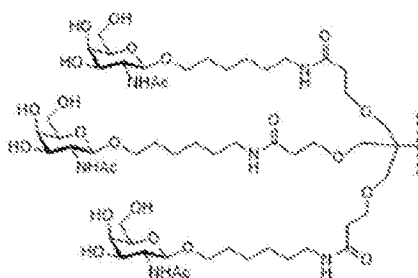


Fórmula II* - a

en donde n es 0, 1, 2, 3 o 4.

25. El agente de ARNi modificado del enunciado 24, en donde n=1.

26. El agente de ARNi modificado del enunciado 23, en donde la GalNAc ramificada comprende

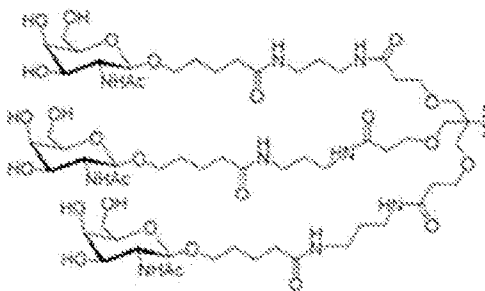


Fórmula VI*

o una forma biantenaria de la misma.

27. El agente de ARNi modificado del enunciado 23, en donde la GalNAc ramificada comprende o una forma biantenaria de la misma.

5

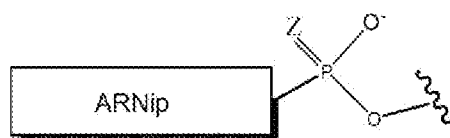


Fórmula VII*

o una forma biantenaria de la misma.

28. El agente de ARNi modificado del enunciado 21, en donde la unión está unida al extremo 5' de la hebra sentido.

29. El agente de ARNi modificado del enunciado 28, en donde la unión está unida como se muestra en la Fórmula IV*.

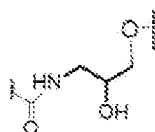


10

en donde Z es P o S.

30. El agente de ARNi modificado del enunciado 28, en donde la unión está unida al extremo 3' de la hebra sentido.

31. El agente de ARNi modificado del enunciado 30, en donde la unión está unida como se muestra en las Fórmulas V*-a o V*-b:



Fórmula V*-a

15



Fórmula V*-b

32. El agente de ARNi modificado del enunciado 31, como se muestra en las Figs. 27A, 27B, 27C o 27D.
33. El agente de ARNi modificado del enunciado 21, en donde el compuesto de ARNi comprende ribosas modificadas que están modificadas en la posición 2'.
- 5 34. El agente de ARNi modificado del enunciado 33, en donde las modificaciones se eligen de 2'-O-metilo, 2'-desoxi-fluoro y 2'-desoxi.
35. El agente de ARNi modificado del enunciado 21, en donde el ARNi contiene uno o más restos protectores de la degradación en cualquiera o en todos los extremos que no están conjugados con el ligando ASGP-R.
- 10 36. El agente de ARNi modificado del enunciado 35, en donde el resto protector de la degradación se elige solo o como cualquier combinación de un grupo que consiste en 1-4 enlaces fosforotioato, 1-4 desoxinucleótidos y 1-4 nucleótidos abásicos invertidos.
37. El agente de ARNi modificado del enunciado 36, en donde los restos protectores de la degradación se eligen de la configuración presente en uno de los siguientes constructos 6.1, 6.2, 6.3, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2, 8.3, 9.1, 9.2. y 9.3.
- 15 39. Un método para preparar el agente de ARNi de los enunciados 1 o 2, mostrándose dicho método en los Ejemplos 11-15.
40. Un método para prevenir, aliviar o tratar una enfermedad en un sujeto, comprendiendo el método administrar, al sujeto, el agente de ARNi de los enunciados 1 o 2 en una cantidad terapéuticamente eficaz para prevenir, aliviar o tratar la enfermedad, previniendo, aliviando o tratando de este modo una enfermedad.
41. El método del enunciado 40, en donde el sujeto es un ser humano.

Tabla A: Resumen de secuencias

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
1.			5' GalNAc~Gm-Am-Cm-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Am-Am-Am-Um-AmsUmsAm-ia-ia 3'		gacuucauccuggaaaaua
2.				3' AmsCms-Cm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'	accugaaaguaggaccuuuau
3.			5' GalNAc~Am-Am-Gm-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-AmsUmsAm-ia-ia 3'		aagcaagaauuuuuuauaau
4.				3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'	uuucguucuaaaaaauuuu
5.			5' GalNAc~Um-Gm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-AmsGmsAm-ia-ia 3'		ugggaaauucauguaaccaaga

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
6.				3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'	cuaccuaaaguacauugguucu
7.			5' ia-ia-GmsAmsCm-Um-Um-Cf-Am-Uf-Cf-Cf-Um-Gm-Gm-Am-Am-Um-Am-Um-Am-GalNAc 3'		gacuuuauccuggaaaaua
8.				3' AmsCmsCm-Um-Gm-Am-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gm-Gm-Am-Cf-Cf-Um-Uf-Um-Am-UmsAfsUm 5'	accugaagaugagaccuuuauu
9.			5' ia-ia-AmsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Af-Uf-Um-Uf-Um-Um-Af-Um-Af-Am-Um-Am-GalNAc 3'		aagcaagaauuuuuuuuaaua
10.				3' Td-Td-UmsUmsUm-Um-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Um-Am-Af-Am-Af-Am-Um-Af-Um-UfsAfsUm 5'	uuuucguucuaaaaaauuuu
11.			5' ia-ia-UmsGmsGm-Gm-Am-Um-Uf-Um-Cf-Af-Uf-Gm-Um-Am-Am-Cm-Cm-Am-Am-Gm-Am-GalNAc 3'		uggauuuuaucauguaaccaaga

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
12.				3' CmsUmsAm-Cm-Cm-Cm-Um-Af-Am-Af-Gm-Um-Am-Cm-Af-Um-Um-Gf-Gm-Um-UmsCfsUm 5'	cuaccuaaaguacauugguucu
13.			5' GalNAc~Gf-Am-Cf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-AfsUmsAf 3'		gacuuuauccuggaauuaa
14.				3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'	accugaagaagaccuuuuuau
15.			5' GalNAc~Af-Am-Gf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Uf-Am-Uf-Am-AfsUmsAf 3'		aagcaagauuuuuuuuaa
16.				3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Am-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'	uuuuguuuuuuuuuuuuuu
17.			5' GalNAc~Uf-Gm-Gf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-AfsGmsAf 3'		uggauuuuaucauacaaaga

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
18.				3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'	cuaccuuaaguacauuguuuu
19.			5' GfsAmsCf-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Cm-Cf-Um-Gf-Gm-Af-Am-Af-Um-Af-Um-Af-GalNAc 3'		gacuucauccuggaauaua
20.				3' AmsCfsCm-Uf-Gm-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Gf-Gm-Af-Cm-Cf-Um-Uf-Um-Af-UmsAfsUm 5'	accugaaguaggaccuuuuuu
21.			5' AfsAmsGf-Cm-Af-Am-Gf-Am-Uf-Am-Uf-Um-Uf-Um-Af-Um-Af-GalNAc 3'		aagcaagauuuuuuuuuuu
22.				3' Td-Td-UmsUfsUm-Uf-Cm-Gf-Um-Uf-Cm-Uf-Am-Uf-Am-Af-Am-Af-Uf-Am-Uf-UmsAfsUm 5'	uuuuuguucuuaaaaauuuuu
23.			5' UfsGmsGf-Gm-Af-Um-Uf-Um-Cf-Am-Uf-Gm-Uf-Am-Af-Cm-Cf-Am-Af-Gm-Af-GalNAc 3'		ugggauuuucauguuaccaaaga

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
24.				3' CmsUfsAm-Cf-Cm-Cf-Um-Af-Am-Af-Gm-Uf-Am-Cf-Am-Uf-Um-Gf-Gm-Uf-UmsCfsUm 5'	cuaccuuaagauacauugguucu
ID de secuencia	ID de dúplex x	ID del ssRN	Secuencia de sentido 5' → 3'	Secuencia antisentido 5' → 3'	Secuencia limpia
25.	ETX005		(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(ET- GalNAc-T1N3)		gacuuuauccugggaaaauua
26.	ETX005			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaaguucsa	uauuuuccagggaagaagucca
27.	ETX001		(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH- DEG)gacuuuCfaUfCfCfugg aaauasusa(invabasic)(invabasic) sic)		gacuuuauccugggaaaauua
28.	ETX001			usAfsuauUfuCfCfaggaUfgAfaaguucsa	uauuuuccagggaagaagucca
29.	ETX014		(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuA faua(NHC6)(MFCO)(ET- GalNAc-T1N3)		aagcaagauuuuuuuuuauua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
30.	ETX014			usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuus usudTdT	uaauuaaaaaauaucuugcuuuu
31.	ETX010		(ET-GalNAc-TIN3)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfuaAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaaaua
32.	ETX010			usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfcUfuGfcuus usudTdT	uaauuaaaaaauaucuugcuuuu
33.	ETX019		(ET-GalNAc-TIN3)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaa(sga(invabasic)(invabasic)		ugggauuucaugauaaccaaga
34.	ETX019			usCfsuugGfuufAfaugAfaAfucccasusc	ucuugguuaacauaaucccauc
35.	ETX023		(invabasic)(invabasic)usgsgauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-TIN3)		ugggauuucaugauaaccaaga
36.	ETX023			usCfsuugGfuufAfaugAfaAfucccasusc	ucuugguuaacauaaucccauc

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
37.		XD-00914	cuuAcGcuGAGuAcuucGAd TsdT		cuuacgcugaguacuucga
38.		XD-00914		UCGAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	ucgaaguacucagcguuag
39.		XD-03999	AGAuAuGcAcAcAcAcGG AdTsdT		agauaugcacacacacgga
40.		XD-03999		UCCGUGUGUGGcAuAUCUdTsdT	uccgugugugucauucu
41.		XD-15421	usesUfcGfuGfgCfcUfuAfaU fgAfaAff(invdT)		ucucguggccuuuaugaaa
42.		XD-15421		UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfas usu	uuucauuaggccacagagauu
43.		X91382	(NH2- DEG)gacuuuCfaUfCfCfugg aaauasusa(invabasic)(invaba sic)		gacuuucauccuggaaaua
44.		X91383	(NH2- DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfu UfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
45.		X91384	(NH2-DEG)ugggauUfuCfAfUfgua accaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
46.		X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfC fuggaaauasusa(invabasic)(invabasic)		gacuuucauccuggaaaua
47.		X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfa fUfuUfuuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaua
48.		X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfU fguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
49.		X91415	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)		gacuuucauccuggaaaua
50.		X91416	(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfa faua(NH2C6)		aagcaagauuuuuuuuaua

ID de secuencia	ID del duplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
51.		X91417	(invabasic)(invabasic)usgsg gauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)		ugggauuucauguaaccaaga
52.		X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaau aua(GalNAc)		gacuuuauccuggaaauaua
53.		X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfu uAfuAfaua(GalNAc)		aagcaagauuuuuuuuaua
54.		X91446	usgsggauUfuCfAfUfguaacca aga(GalNAc)		ugggauuucauguaaccaaga
55.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faagucscsa		uauuuuccagggaagaaagucca
56.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuusudIdT		uauuauaaaaauaucuugcuuuu
57.		X38104	usCfsuugGfuuAfcangAfaAf uocccasuc		ucuugguuacaugaaaucccauc
58.		X91388	(MFCO)(NH- DEG)gacuuuCfaUfCfCfugg aaauasusa(invabasic)(invaba sic)		gacuuuauccuggaaauaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
59.		X91389	(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuAfuAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuuaaaua
60.		X91390	(MFCO)(NH-DEG)uggauUfuCfaUfguaaccaagsa(invabasic)(invabasic)		uggauuucaguaaccaaga
61.		X91421	(invabasic)(invabasic)gsacuuCfaUfcCfuggaaauasua(NHC6) (MFCO)		gacuucauccuggaaaua
62.		X91422	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuAfuAfaa(NHC6)(MFCO)		aagcaagauauuuuuuaaaua
63.		X91423	(invabasic)(invabasic)jugsggauUfuCfaUfguaaccaaga(NHC6) (MFCO)		uggauuucaguaaccaaga
64.		X91394	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)gacuuuCfaUfcCfugg		gacuucauccuggaaaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
			aaauasusa(invabasic)(invabasic)		
65.		X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfUfAfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaa
66.		X91396	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH-DEG)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasga(invabasic)(invabasic)		uggauuucauguaaccaaga
67.		X91427	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfcCfcfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		gacuuucauccuggaaaua
68.		X91428	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfuAfUAfaa(NHC6)(MFCO)(GalNAc-T1)		aagcaagauuuuuuuuaa

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
69.		X91429	(invabasic)(invabasic)usgsg gauUfuCfAfUfguaccaaga(NHC6)(MFCO)(GalNAc- T1)		ugggauuucauguaaccaaga
70.	ETX001	X91394	(GalNAc- T1)(MFCO)(NHDEG)gacuu uCfaUfCfCfuggaaauasusa(in vabasic)(invabasic)		gacuuuuccugggaaauua
71.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faagucscsa		uauuuuccagggaagaaugucca
72.	ETX005	X91427	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NHC6)(MFCO)(GalNAc- T1)		gacuuuuccugggaaauua
73.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faagucscsa		uauuuuccagggaagaaugucca
74.	ETX010	X91395	(GalNAc-T1)(MFCO)(NH- DEG)aaGfcAfaGfaUfAfUfu UfuuAfuaFasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagaauuuuuuuaaua

[illegible]

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
82.	ETX006		(invabasic)(invabasic)gsacu uuCfaUfCfCfuggaauasusa(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		gacuuuauccuccuggaaaaua
83.	ETX006			usAfsuuUfuCfCfaggaUfgAfaagucsa	uauuuuuccaggauaaaaua
84.	ETX002		(ET-GalNAc- T2CO)(NH2C12)gacuuuCfa UfCfCfuggaauasusa(invaba sic)(invabasic)		gacuuuauccuccuggaaaaua
85.	ETX002			usAfsuuUfuCfCfaggaUfgAfaagucsa	uauuuuuccaggauaaaaua
86.	ETX004		(ET-GalNAc- T2CO)(NH2C12)GfaCfuUf uCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsu sAf		gacuuuauccuccuggaaaaua
87.	ETX004			usAfsuAfuUfuCfCfAfgGfaUfgAfaAfgUf csCfsa	uauuuuuccaggauaaaaua
88.	ETX008		GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfg AfaAfuAfuAf(NHC6)(ET- GalNAc-T2CO)		gacuuuauccuccuggaaaaua
89.	ETX008			usAfsuAfuUfuCfCfAfgGfaUfgAfaAfgUf csCfsa	uauuuuuccaggauaaaaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
90.	ECX008 (menor pureza)		GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfg Afa^fu^AfuAf(NHCH6)(ET- GalNAc-T2CO)		gacuuuauccuccuggaaaauaa
91.	ECX008 (menor pureza)			usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUfgAfaAfgUf csCfsa	uaauuuuccaggauaagaagucca
92.	ETX011		(ET-GalNAc- T2CO)(NH2C12)aaGfcAfa GfaUfAfuUfuUfuAfuAfasus a(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaauaa
93.	ETX011			usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuus usudTdT	uaauuaaaaaauucucugcuuuu
94.	ETX015		(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfAfuUfuUfuAfuA faua(NHCH6)(ET-GalNAc- T2CO)		aagcaagauuuuuuuuaauaa
95.	ETX015			usAfsUfuAfuAfaAfaUfcUfuGfcuus usudTdT	uaauuaaaaaauucucugcuuuu

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
96.	ETX013		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauuuuuuuuaaaua
97.	ETX013			usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUf usUfsudTdT	uuuuuaaaaaauaucuugcuuuu
98.	ETX017		AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaΛfuΛf(NHCC6)(ET-GalNAc-T2CO)		aagcaagauuuuuuuuaaaua
99.	ETX017			usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUf usUfsudTdT	uuuuuaaaaaauaucuugcuuuu
100.	ETX020		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)ugggauUfuCfaUfiguaaccaagsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuuucauguaccaaga
101.	ETX020			usCfsuugGfuuAfcaugAfaAtucccasusc	ucuugguuacaugaaaucuccauc
102.	ETX022		(ET-GalNAc-T2CO)(NH ₂ C12)UfgGfgAfuUfuCfaUfgUfaAfcCfaAfsugsAf		ugggauuuucauguaccaaga

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
103.	ETX022			usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCf asUfsc	ucuugguuacaugaaaucccauc
104.	ETX024		(invabasic)(invabasic)usgsg gauUfuCfaUfguaaccaaga(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)		ugggauuucauguaaccaaga
105.	ETX024			usCfsuugGfuUfaCfaUfuucccasusc	ucuugguuacaugaaaucccauc
106.	ETX026		UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgAf(NHC6)(ET- GalNAc-T2CO)		ugggauuucauguaaccaaga
107.	ETX026			usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAfaAfuCfcCf asUfsc	ucuugguuacaugaaaucccauc
108.	XD-00914		cuuAcGcuGAGuAcuucGAd TsdT		cuuacgcugaguacuuga
109.	XD-00914			UCGAAAGuACUcAGCGuAAGdTsdT	ucgaaguacucagcguaag
110.	XD-03999		AGAuAuGcAcAcAcAcGG AdTsdT		agauaugcacacacacgga
111.	XD-03999			UCCGUGUGUGUGcAuAUCUdTsdT	uccgugugugcauauu
112.	XD-15421		usesUfcGfuGfgCfcUfuAfaU fgAfaA(invT)		ucucguggccuuuaugaaa

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
113.	XD-15421			UfsUfsuCfaUfuAfaGfgCfcAfcGfaGfas usu	uuucaaauaaggccacgagauu
114.		X91382	(NH2- DEG)gacuuuCfaUfCfCfugg aaauasusa(invabasic)(invaba sic)		gacuuucauccuggaaaaua
115.		X91383	(NH2- DEG)aaGfcAfaGfaUfaUfu UfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauauuuuuuaua
116.		X91384	(NH2- DEG)ugggauUfuCfaUfgua accaasgsa(invabasic)(invaba sic)		ugggauuucauguaaccaaga
117.		X91385	(NH2- DEG)GfaCfuUfuCfaUfcCfu GfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaaaua
118.		X91386	(NH2- DEG)AfaGfcAfaGfaUfaUfu UfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauauuuuuuaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
119.		X91387	(NH2- DEG)UfgGfgAfuUfuCfaUfg UfaAfcCfaAfsGsAf		ugggauuucauguaaccaaga
120.		X91403	(NH2C12)gacuuuCfaUfCfC fuggaaauasusa(invabasic)(in vabasic)		gacuuuauccuggaaaua
121.		X91404	(NH2C12)aaGfcAfaGfaUfa fUfuUfuUfaAfuAfasusa(invab asic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaua
122.		X91405	(NH2C12)ugggauUfuCfAfU fguaaccaasgsa(invabasic)(in vabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
123.		X91406	(NH2C12)GfaCfuUfuCfaUf cCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuuauccuggaaaua
124.		X91407	(NH2C12)AfaGfcAfaGfaUf aUfuUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauuuuuuuuaua
125.		X91408	(NH2C12)UfgGfgAfuUfuCf aUfgUfaAfcCfaAfsGsAf		ugggauuucauguaaccaaga

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
126.		X91415	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfCfCfuggaaauasusa(NH2C6)		gacuuucauccuggaaaua
127.		X91416	(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfAfUfuUfuUfuAfuA faua(NH2C6)		aagcaagauuuuuuuuaua
128.		X91417	(invabasic)(invabasic)usgsg gauUfuCfAfUfguaaccaaga(NH2C6)		ugggauuucauguaaccaaga
129.		X91418	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfg AfaAfuAfuAf(NH2C6)		gacuuucauccuggaaaua
130.		X91419	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfu UfaUfaAfuAf(NH2C6)		aagcaagauuuuuuuuaua
131.		X91420	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgAf(NH2C6)		ugggauuucauguaaccaaga
132.		X91379	gsascuuuCfaUfCfCfuggaaau aua(GalNAc)		gacuuucauccuggaaaua
133.		X91380	asasGfcAfaGfaUfAfUfuUfu uAfuAfaua(GalNAc)		aagcaagauuuuuuuuaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
134.		X91446	usgggauUfuCfAfUfguaacca aga(GalNAc)		ugggauuucauguaaccaaga
135.		X38483	usAfsuauUfuCfCfaggaUfgA faaguicsa		uaauuuuccaggaugaagucca
136.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauaUfc UfuGfcuusudTdT		uaauuaaaaaauucuuugcuuuu
137.		X38104	usCfsuugGftuuAfcAugAfaAf ucccausuc		ucuugguuacaugaaaaucccauc
138.		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUf gAfaAfgUfcsCfsa		uaauuuuccaggaugaagucca
139.		X91400	usAfsuUfaUfaAfaAfaUfaUf cUfuGfcUfusUfsudTdT		uaauuaaaaaauucuuugcuuuu
140.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAf aAfuCfcCfasUfsc		ucuugguuacaugaaaaucccauc
141.		X91409	(GalNAc- T2)(NH ₂ C12)gacuuuCfaUf CfCfuggaauasusa(invabasic)x(invabasic)		gacuuucauccuggaaaaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
142.		X91410	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfasusa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaaua
143.		X91411	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)ugggauUfuCfAfUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauucauguaaccaaga
144.		X91412	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)GfaCfuUfuCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsusAf		gacuuucauccuggaaaaua
145.		X91413	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfaUfaAfsusAf		aagcaagauuuuuuuuaaua
146.		X91414	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)UfgGfgAfuUfaUfaUfgUfaAfcCfaAfsusAf		ugggauucauguaaccaaga
147.		X91433	(invabasic)(invabasic)gsascuuCfaUfcCfuggaaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaaaua

ID de secuencia	ID del duplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
148.		X91434	(invabasic)(invabasic)asasGf cAfaGfaUfaAfUfuUfuUfuA faua(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauuuuuuuuaaua
149.		X91435	(invabasic)(invabasic)usgsg gauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)		uggauuucauguaaccaaga
150.		X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfg AfaAfuAfuAf(NHC6)(GalN Ac-T2)		gacuuucauccuggaaaua
151.		X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfu UfaUfaAfuAf(NHC6)(GalN Ac-T2)		aagcaagauuuuuuuuaaua
152.		X91438	UfsgGfgAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgAf(NHC6)(GalN Ac-T2)		uggauuucauguaaccaaga
153.	ETX002	X91409	(GalNAc- T2)(NH2C12)gacuuuUfaUf CfCfuggaaauasusa(invabasic) (invabasic)		gacuuucauccuggaaaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
154.		X38483	usAfsuauUfuCfcFaggaUfgA faagucscsa		uauauuccagggaagaaauuca
155.	ETX004	X91412	(ET-GalNAc- T2CO)(NH ₂ C12)GfaCfuUf uCfaUfcCfuGfgAfaAfuAfsu sAf		gacuuucauccuggaaaauua
156.		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUf gAfaAfgUfcsCfsa		uauauuccagggaagaaauuca
157.	ETX006	X91433	(invabasic)(invabasic)gsascu uuCfaUfcCfcfuggaaauasusa(NHC6)(GalNAc-T2)		gacuuucauccuggaaaauua
158.		X38483	usAfsuauUfuCfcFaggaUfgA faagucscsa		uauauuccagggaagaaauuca
159.	ETX008	X91436	GfsasCfuUfuCfaUfcCfuGfg AfaAfuAfuAf(NHC6)(GalN Ac-T2)		gacuuucauccuggaaaauua
160.		X91398	usAfsuAfuUfuCfcAfgGfaUf gAfaAfgUfcsCfsa		uauauuccagggaagaaauuca

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
161.	ETX011	X91410	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)aaGfcAfaGfaUfaUfuUfuuAfuAfasa(invabasic)(invabasic)		aagcaagauuuuuuuuaaua
162.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauUfucUfuGfcuusudTdT		uuuuuaaaaaauucuugcuuuu
163.	ETX013	X91413	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)AfaGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfsusAfcUfuGfcUfusUfsudTdT		aagcaagauuuuuuuuaaua
164.		X91400	usAfsUfaUfaAfaAfaUfaUfcUfuGfcUfusUfsudTdT		uuuuuaaaaaauucuugcuuuu
165.	ETX015	X91434	(invabasic)(invabasic)asasGfcAfaGfaUfaUfuUfuuAfuAfaua(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauuuuuuuuaaua
166.		X91381	usAfsUfuAfuaAfaAfauUfucUfuGfcuusudTdT		uuuuuaaaaaauucuugcuuuu
167.	ETX017	X91437	AfsasGfcAfaGfaUfaUfuUfuUfaUfaAfaA(NHC6)(GalNAc-T2)		aagcaagauuuuuuuuaaua

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
168.		X91400	usAfsuUfaUfaAfafaUfaUfcUfuGfcUfusUfisdTdT		uuuuuaaaaaauucuuuuuuuu
169.	ETX020	X91411	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)ugggauUfuCfAUfguaaccaasgsa(invabasic)(invabasic)		ugggauuucauguaaccaaga
170.		X38104	usCfsuugGfuuAifcaugAfaAfucccasusc		ucuugguuacaugaauuccauc
171.	ETX022	X91414	(GalNAc-T2)(NH ₂ C12)UfgGfgAfuUfcfaUfgUfaAfcCfaAfsgsAfa		ugggauuucauguaaccaaga
172.		X91402	usCfsuUfgGfuuUfaCfaUfgAfaAfucfcCfasUfsc		ucuugguuacaugaauuccauc
173.	ETX024	X91435	(invabasic)(invabasic)usgsggauUfuCfAfUfguaaccaaga(NHC6)(GalNAc-T2)		ugggauuucauguaaccaaga
174.		X38104	usCfsuugGfuuAifcaugAfaAfucccasusc		ucuugguuacaugaauuccauc

ID de secuencia	ID del dúplex	ID del ssRN	Secuencia de sentido	Secuencia antisentido	Secuencia limpia
175.	ETX026	X91438	UfsgsGfgAfuUfuCfaUfgUfa AfcCfaAfgAf(NHC6)(GalN Ac-T2)		ugggauuucauguaaccaaga
176.		X91402	usCfsuUfgGfuUfaCfaUfgAf aAfuCfcCfasUfsc		ucuugguuacaugaaaucccauc

Clave:

Clave para SEQ ID NOs: 1-24

ia	nucleótido abásico invertido (1,2-didesoxirribosa)
m	2'-O-metil nucleótido
f	2'-desoxi-2'-fluoronucleótido
s	enlace internucleotídico de fosforotioato (modificación del esqueleto de fosforotioato)
~	unión
Td	desoxitimidina

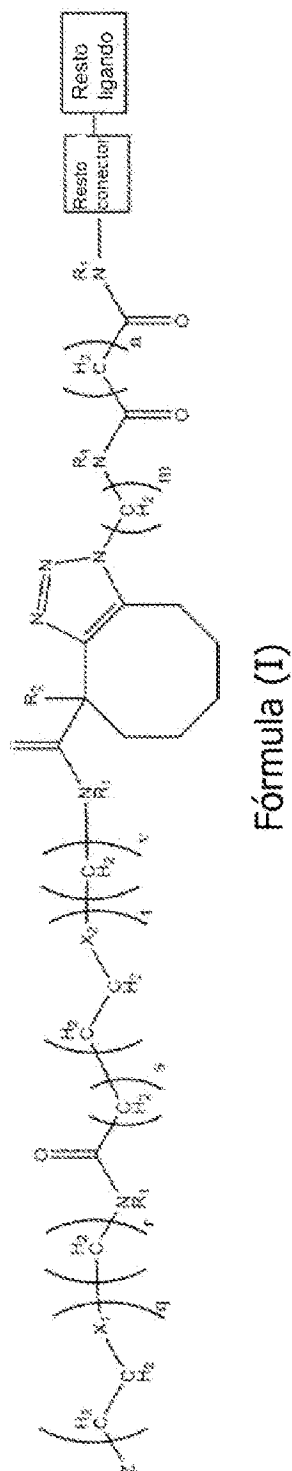
Clave para SEQ ID NO: 25-176

dG, CC, dA, dT	residuos de ADN
GalNAc	N-acetilgalactosamina
G, C, A, U	residuos de ARN
g, c, a, u	Residuos modificados con 2'-O-metilo
Gf, Cf, Af, Uf	Residuos modificados con 2'-fluoro
s	Modificación del esqueleto de fosforotioato
ARNip	ARN de interferencia pequeño
MFCO	Monofluoro ciclooctino
invabasic	1,2-didesoxirribosa
(invabasic)(invabasic)	Nucleótidos en un polinucleótido general, que son los 2 nucleótidos terminales que tienen restos de azúcar que son (i) abásicos, y (ii) de configuración invertida, por lo que el enlace entre el penúltimo nucleótido y el antepenúltimo nucleótido tiene un enlace inverso, concretamente un enlace 5-5 o 3-3.
NH2-DEG/NHDEG	Conector aminoetoxietilo
NH2C12	Conector aminododecilo
NH2C6/NHC6	Conector aminohexilo
ET	(E-therapeutics - referencia de la empresa)
(ET-GalNAc-T1N3)(MFCO)(NH-DEG)	unión T1b
(ET-GalNAc-T2CO)(NH2C12)	unión T2b
(NHC6)(MFCO)(ET-GalNAc-T1N3)	unión T1a
(NHC6)(ET-GalNAc-T2CO)	unión T2a
T1N3	unión T1
T2Co	unión T2
(GalNAc-)T1	unión GalNac T1
(GalNAc-)T2	unión GalNac T2

Nota: la clave se refiere a la secuencia sentido y antisentido, mientras que la secuencia limpia contiene únicamente el nucleótido de ARN subyacente.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que comprende la siguiente estructura:



en donde:

- 5 R_1 en cada aparición se selecciona independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, metilo y etilo;
 X_1 y X_2 en cada aparición se seleccionan independientemente del grupo que consiste en metileno, oxígeno y azufre;
 m es un número entero de 1 a 6;

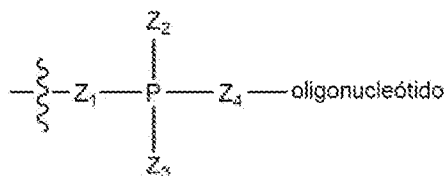
n es un número entero de 1 a 10;

q, r, s, t, v son independientemente números enteros de 0 a 4, con la condición de que:

(i) q y r no pueden ser ambos 0 al mismo tiempo; y

(ii) s, t y v no pueden ser todos 0 al mismo tiempo;

5 Z es un resto oligonucleótido representado por la siguiente estructura:



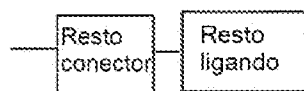
en donde:

Z₁, Z₂, Z₃, Z₄ son independientemente en cada aparición oxígeno o azufre; y

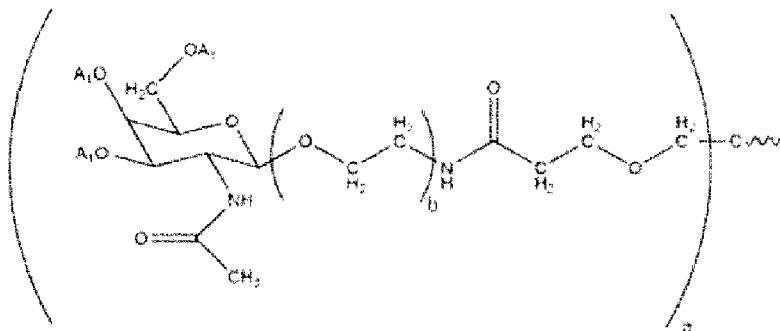
uno de los enlaces entre P y Z₂, y P y Z₃ es un enlace simple y el otro enlace es un enlace doble,

10 R₂ es flúor,

y



como se representa en la Fórmula (I) es



15

en donde:

A₁ es hidrógeno;

a es un número entero de 2 o 3; y

b es un número entero de 2 a 5.

20 2. Un compuesto según la reivindicación 1, en donde R₁ es hidrógeno en cada aparición.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 o 2, en donde m = 3.

4. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde n = 6.

5. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde X₁ es oxígeno y X₂ es metileno, y preferiblemente en donde:

25 q = 1,

r = 2,

$s = 1,$

$t = 1,$

$v = 1.$

- 5 6. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde tanto X_1 y X_2 son metileno, y preferiblemente en donde:

$q = 1,$

$r = 3,$

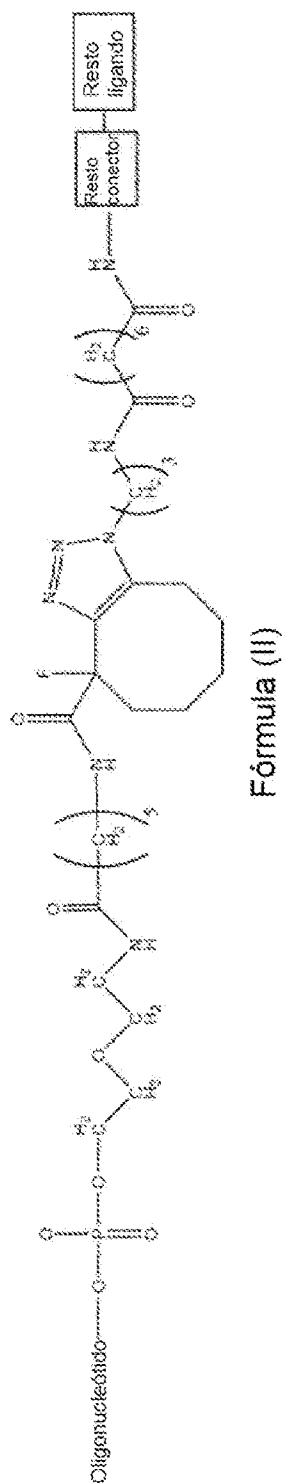
$s = 1,$

$t = 1,$

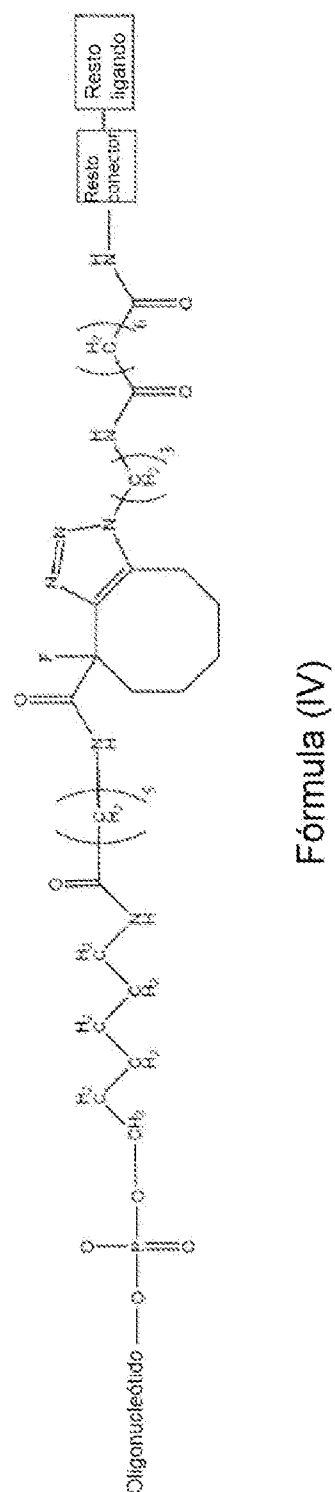
- 10 $v = 1.$

- 15 7. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicho oligonucleótido es un compuesto de ARN capaz de modular, preferiblemente inhibir, la expresión de un gen objetivo, y en donde dicho compuesto de ARN comprende un dúplex de ARN que comprende las hebras primera y segunda, en donde la primera hebra es al menos parcialmente complementaria a una secuencia de ARN de un gen objetivo, y la segunda hebra es al menos parcialmente complementaria a dicha primera hebra, y en donde cada una de las hebras primera y segunda tiene extremos 5' y 3'.

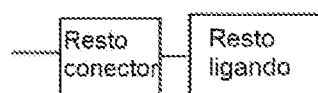
8. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el compuesto comprende la siguiente estructura de Fórmula (II):



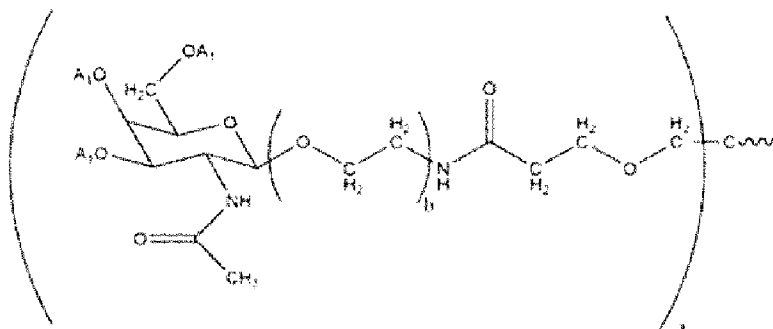
o comprende la siguiente estructura de Fórmula (IV):



en donde



como se representa en la Fórmula (II) o la Fórmula (IV) es



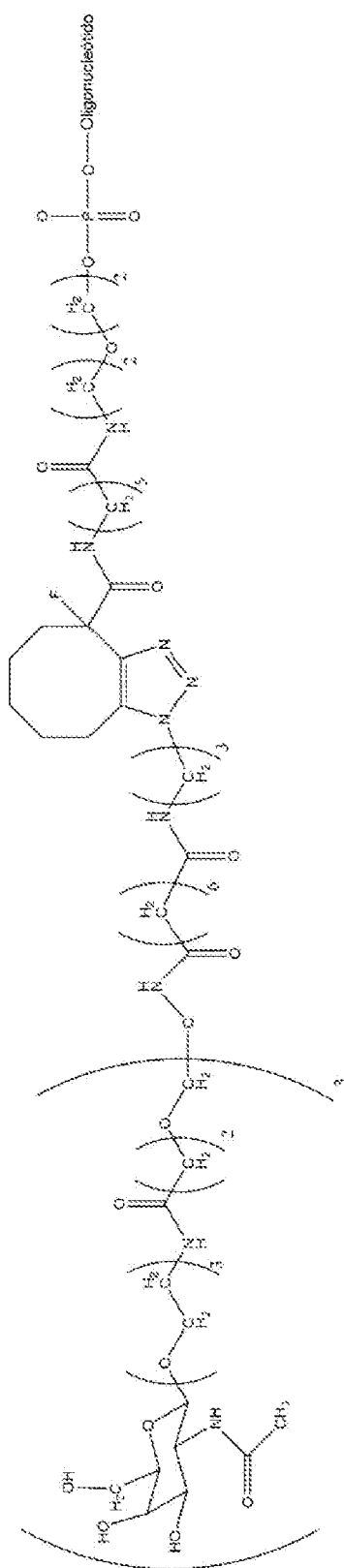
en donde:

A₁ es hidrógeno;

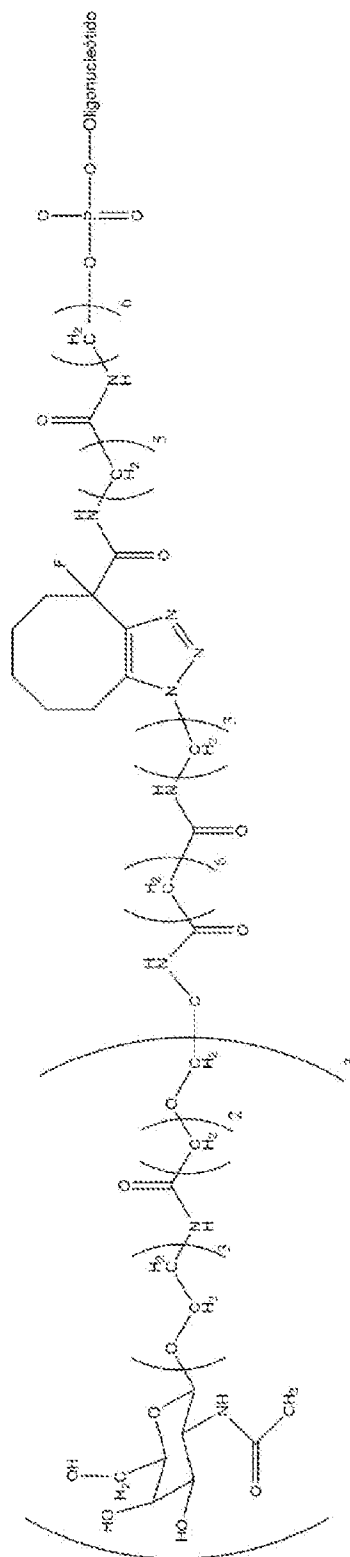
5 a es un número entero de 2 o 3; y

b es un número entero de 2 a 5.

9. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el compuesto se selecciona entre los siguientes:



Fórmula (VIII)



Fórmula (X)

10. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el oligonucleótido comprende además uno o más restos protectores de la degradación en uno o más extremos, en donde dichos uno o más restos protectores de la degradación se seleccionan entre enlaces internucleotídicos fosforotioato, enlaces internucleotídicos fosforoditioato y nucleótidos abásicos invertidos, en donde dichos nucleótidos abásicos invertidos están presentes en el extremo distal de la hebra que porta los restos de ligando.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

12. Un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o una composición según la reivindicación 11, para uso en terapia.

Figura 1

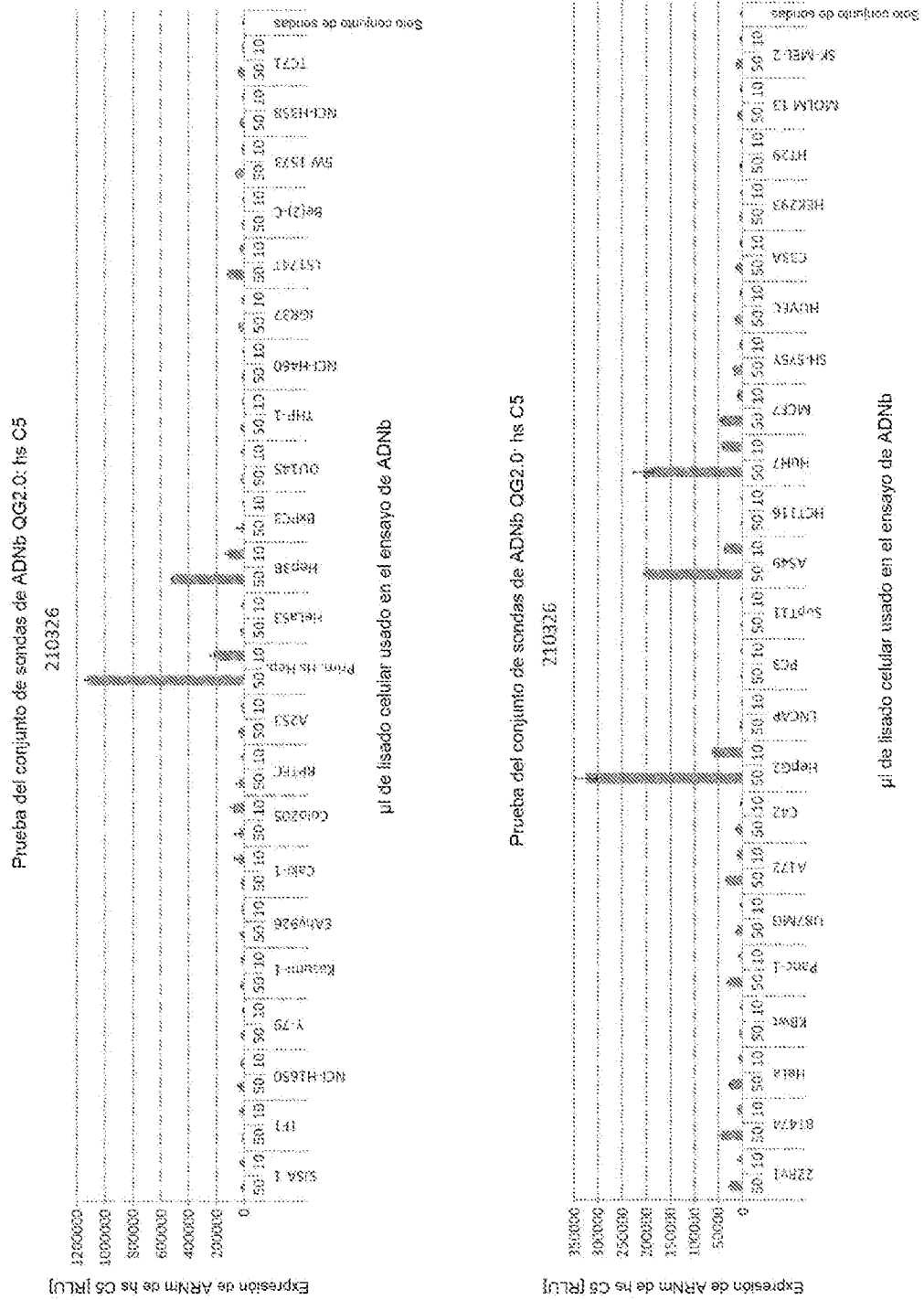


Figura 2

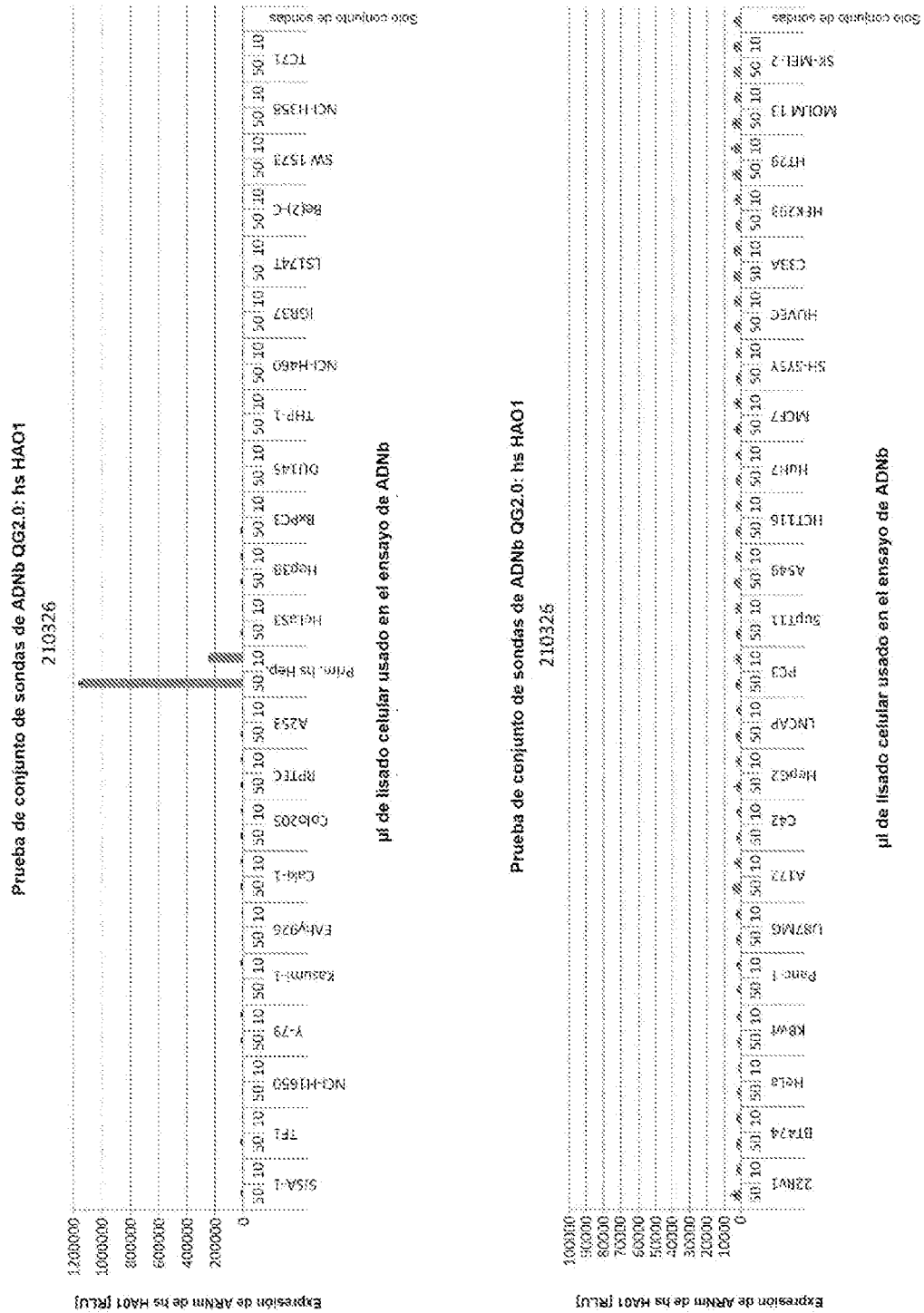


Figura 3

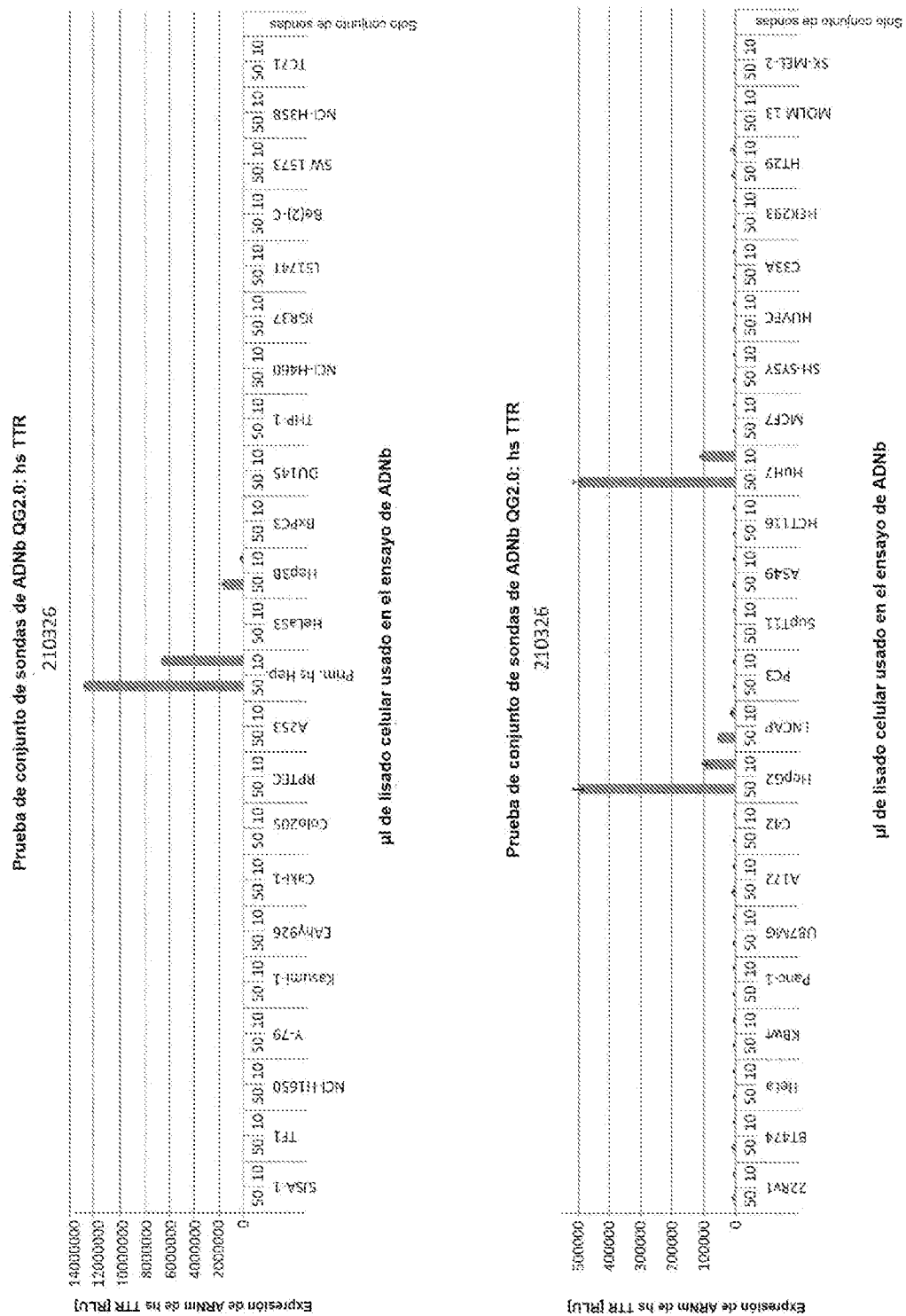


Figura 4A

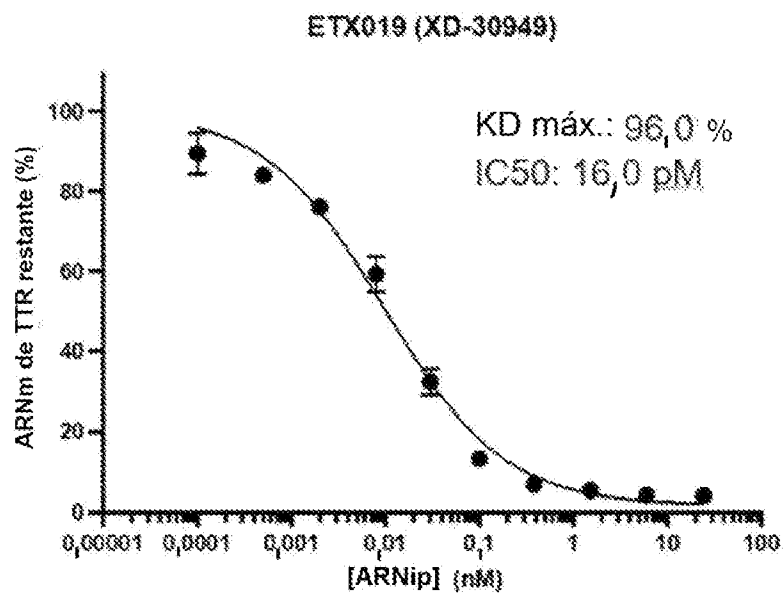


Figura 4B

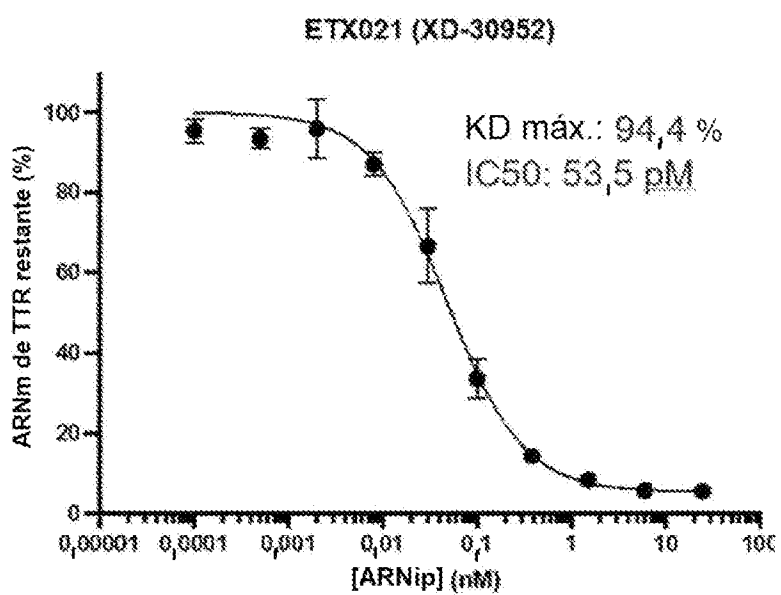


Figura 4C

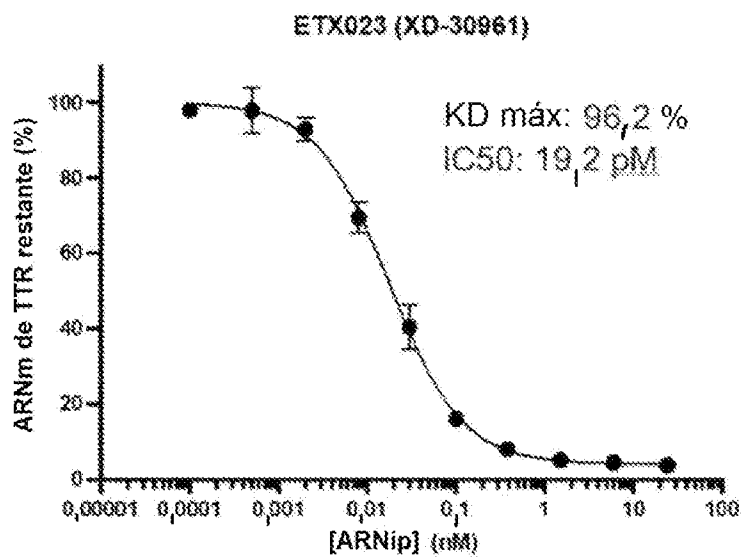


Figura 4D

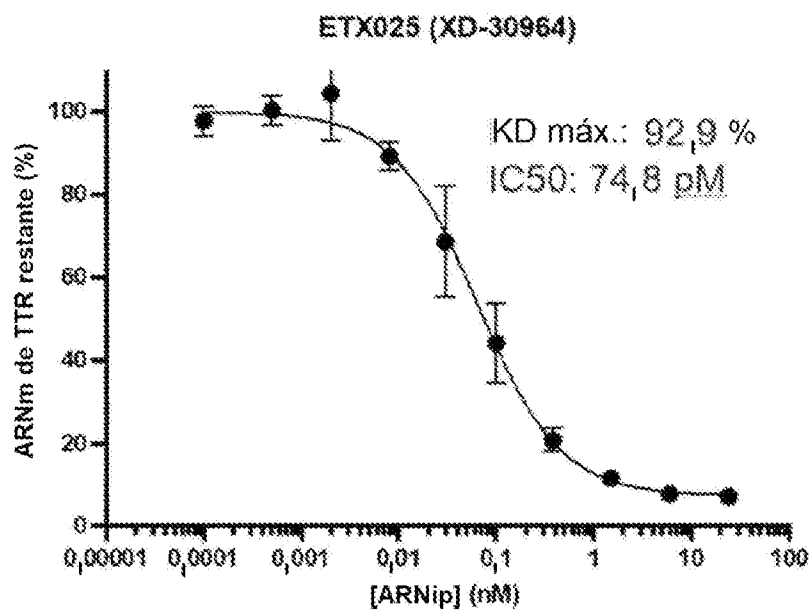


Figura 5A

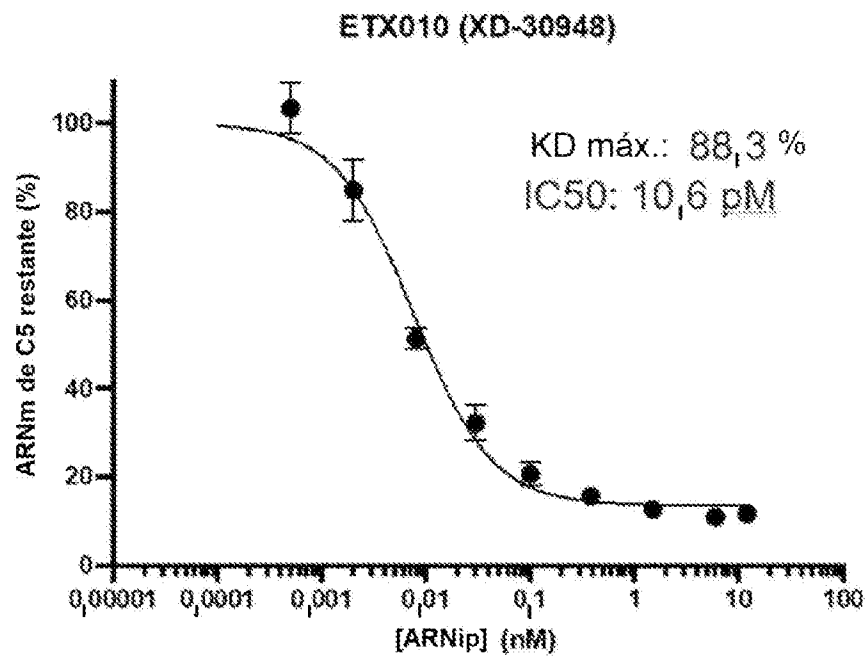


Figura 5B

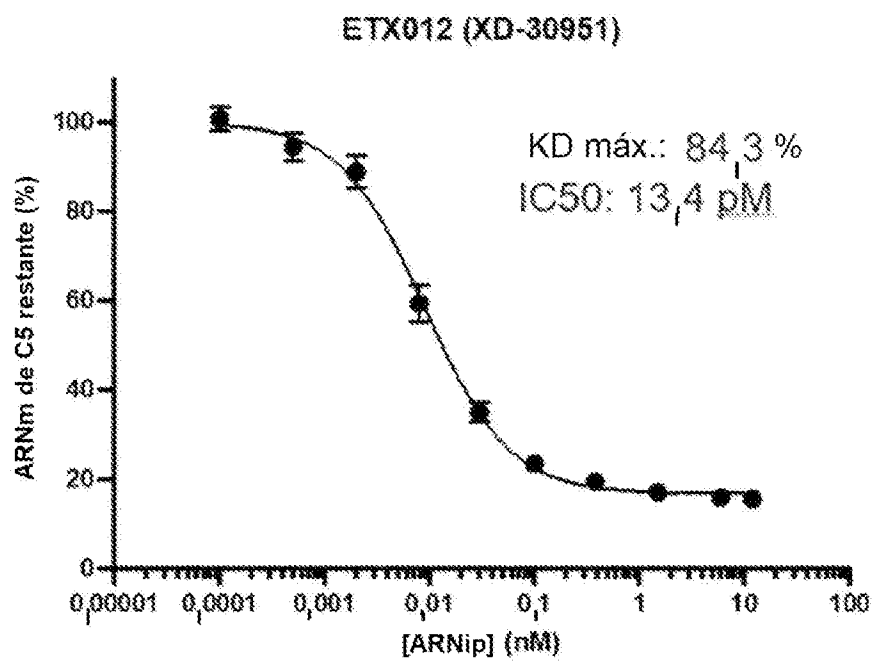


Figura 5C

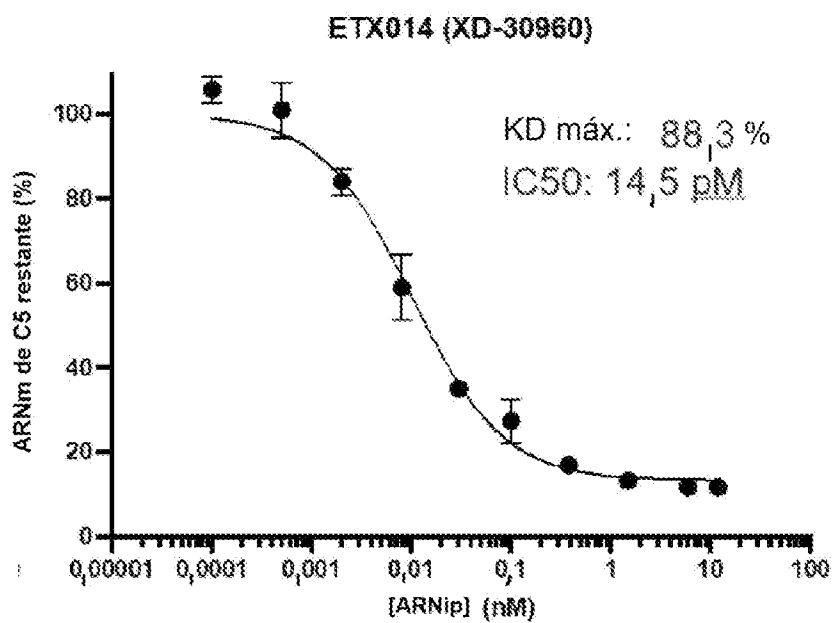


Figura 5D

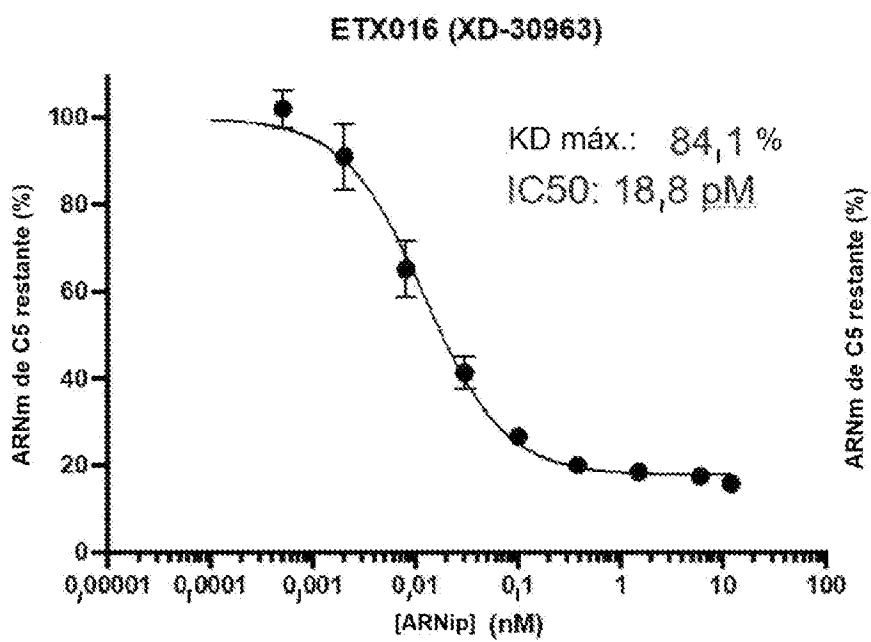


Figura 6

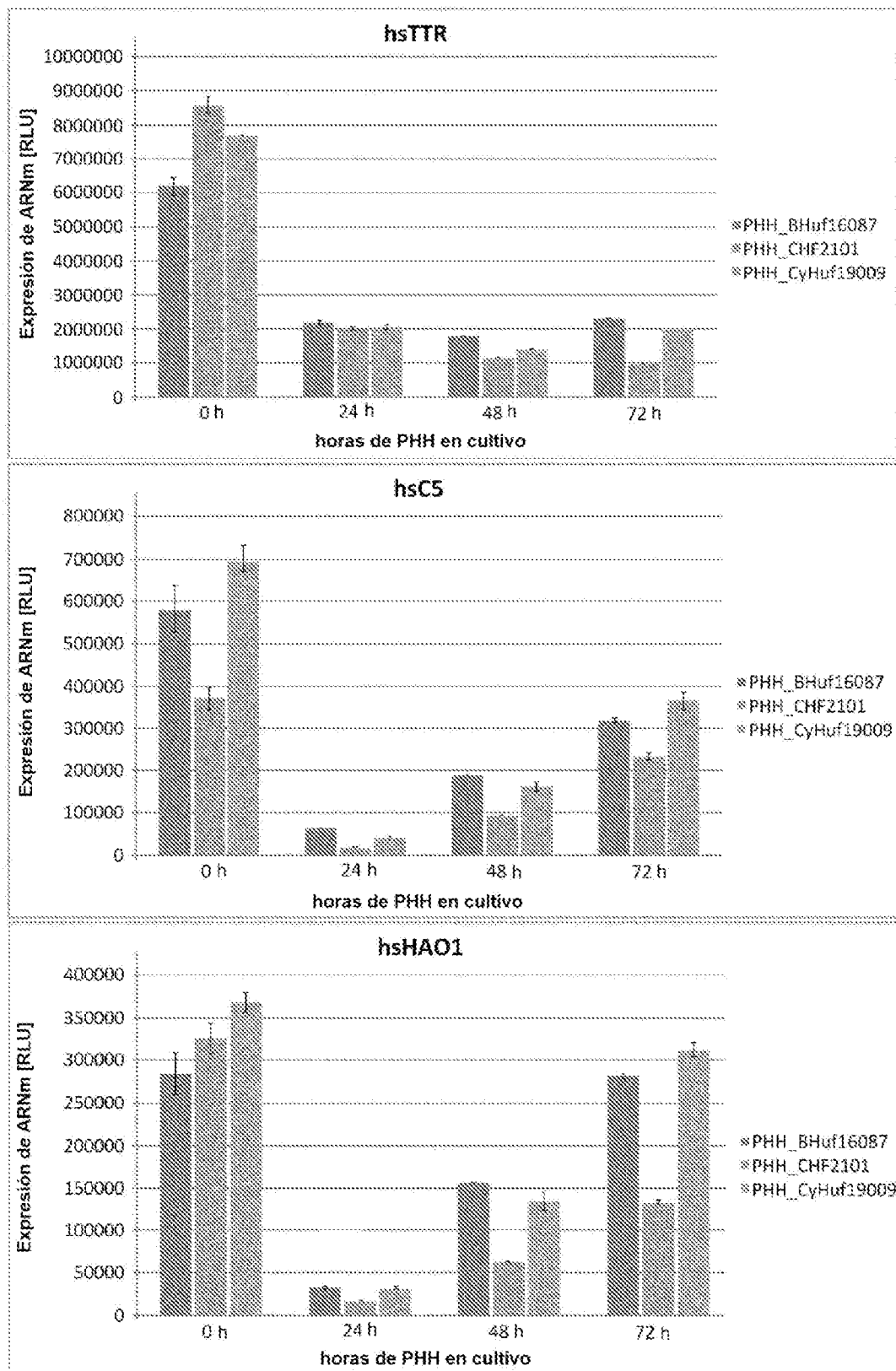


Figura 7

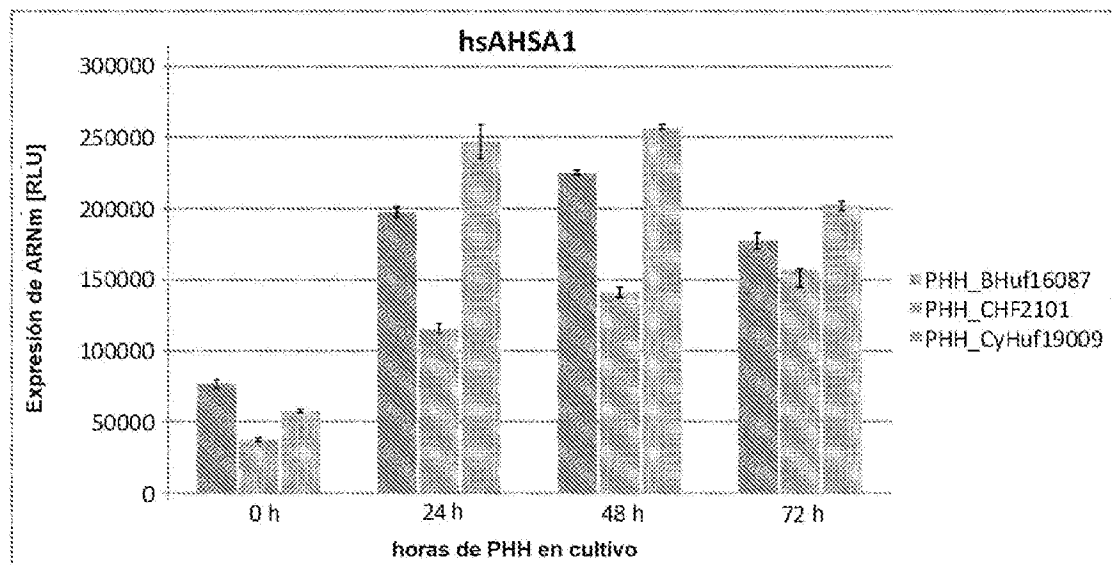
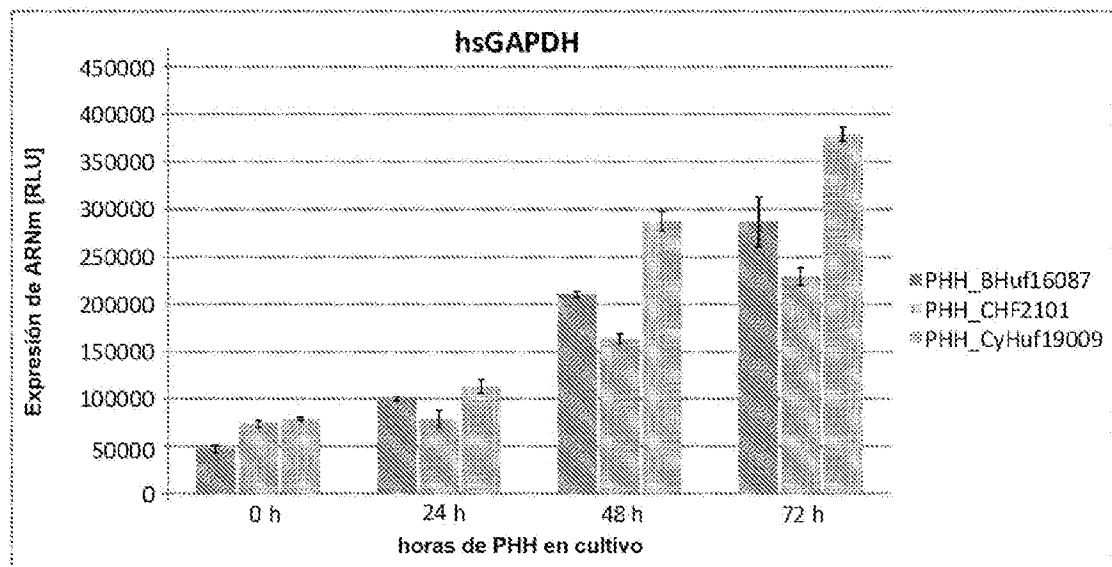


Figura 8A

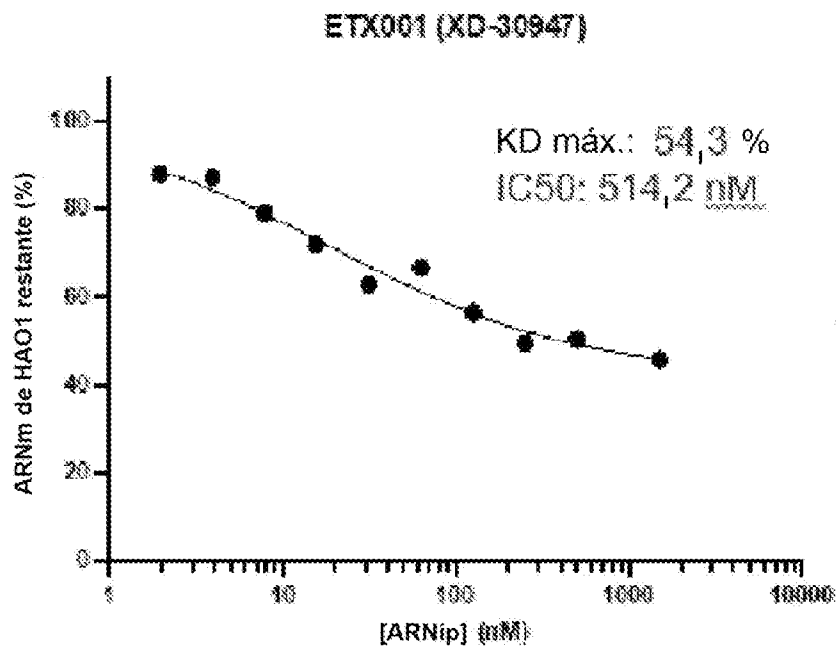


Figura 8B

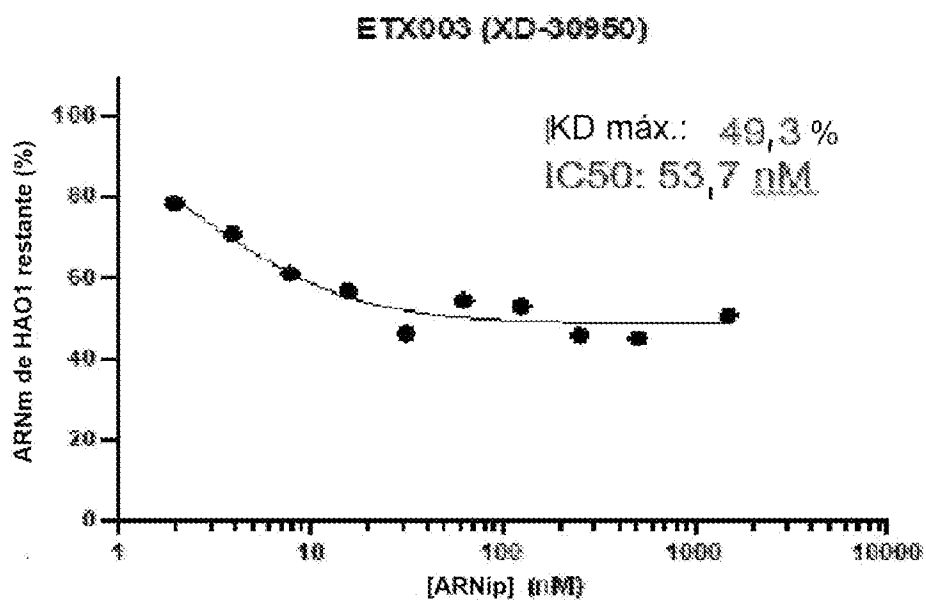


Figura 8C

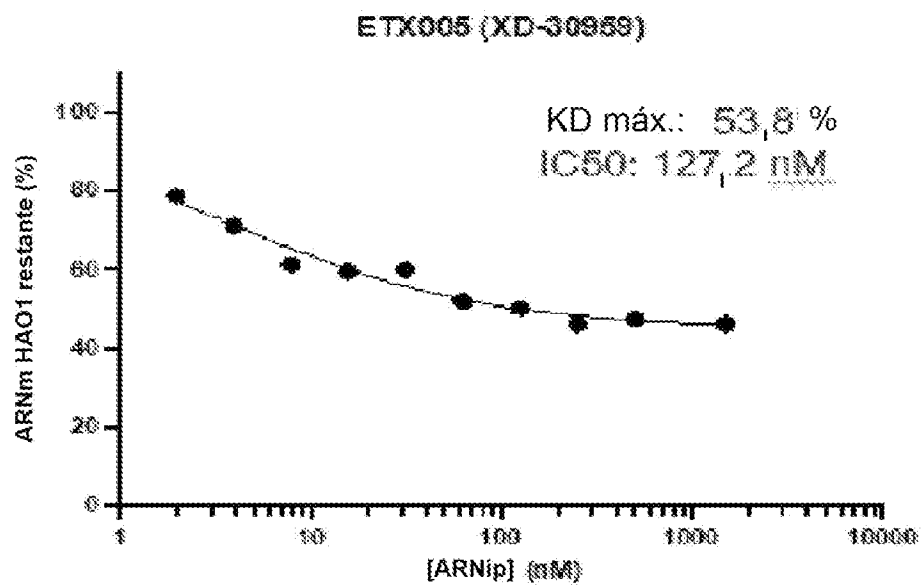


Figura 8D

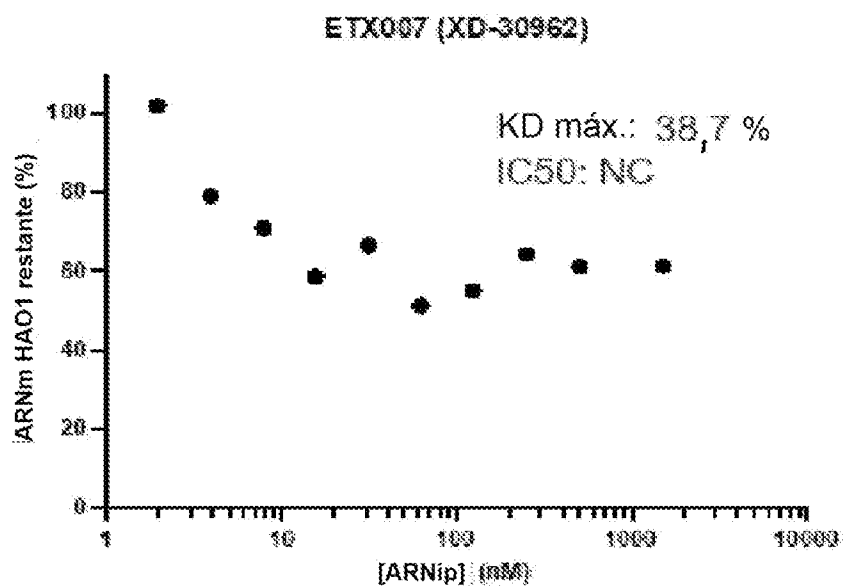


Figura 9A

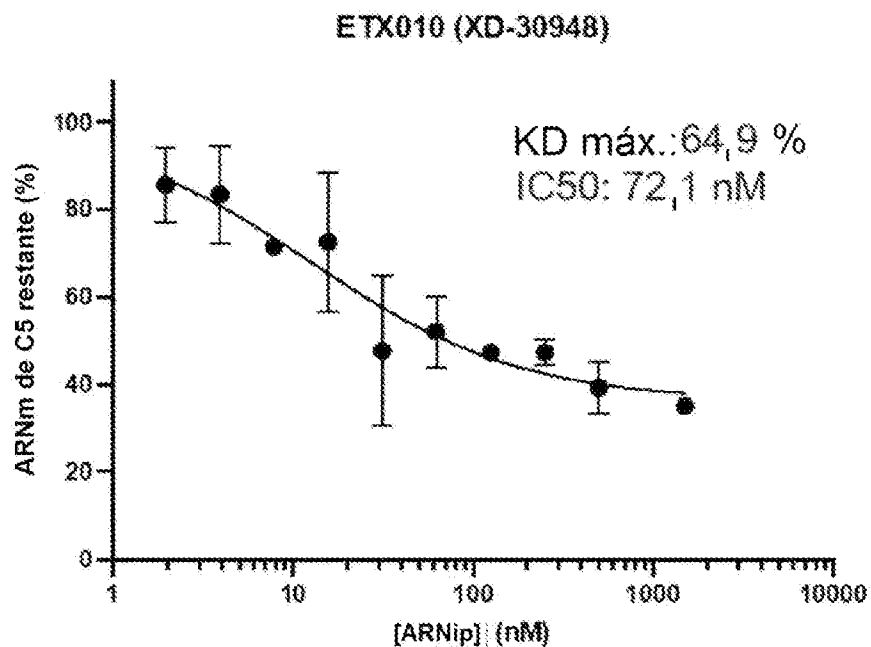


Figura 9B

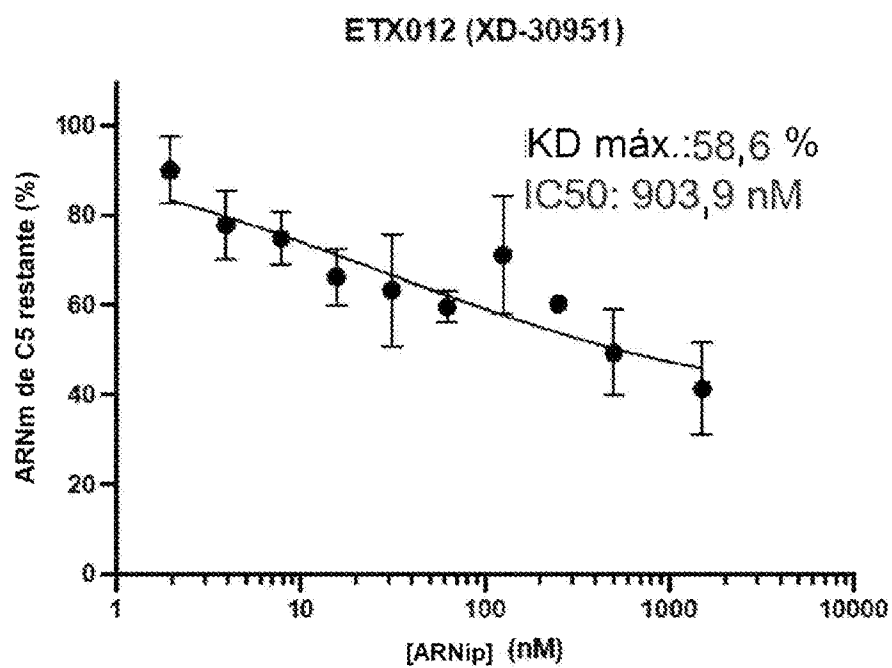


Figura 9C

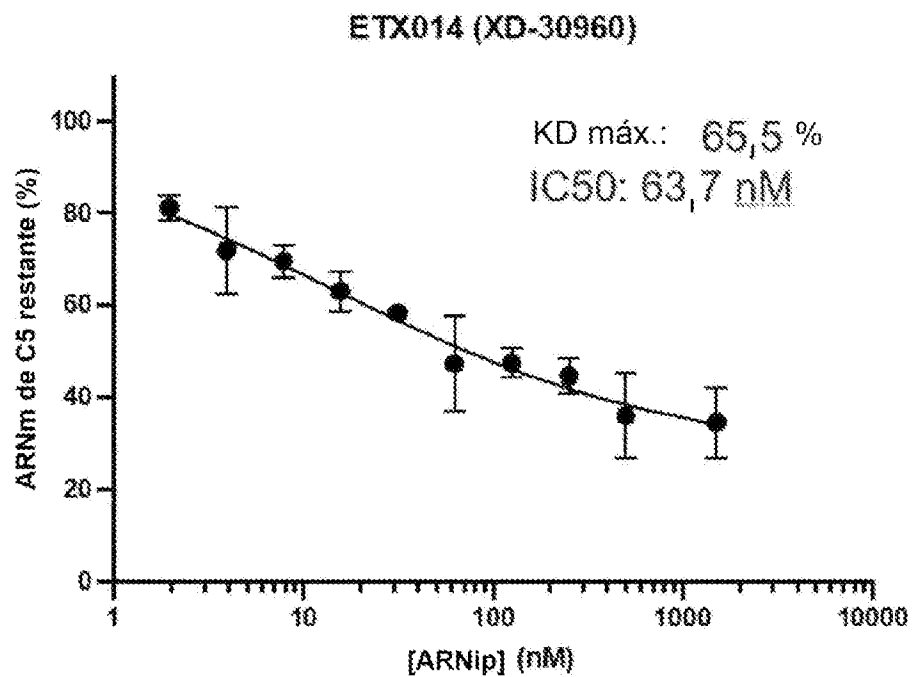


Figura 9D

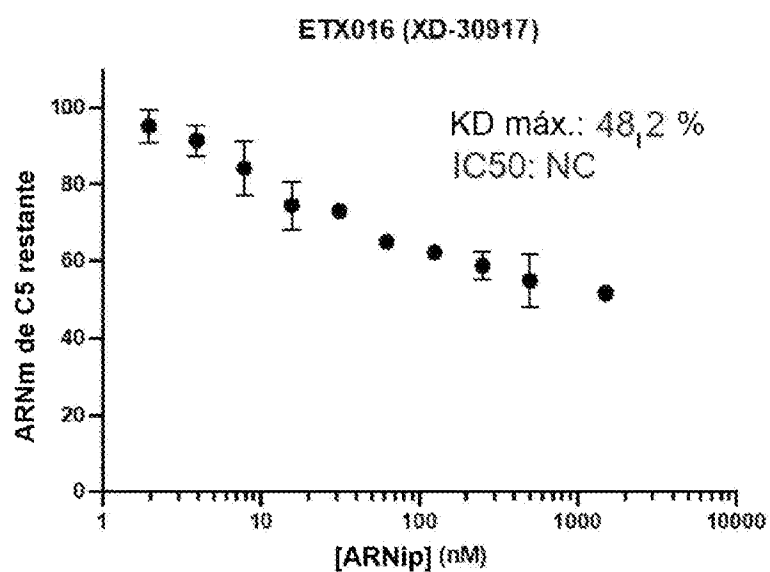


Figura 10A

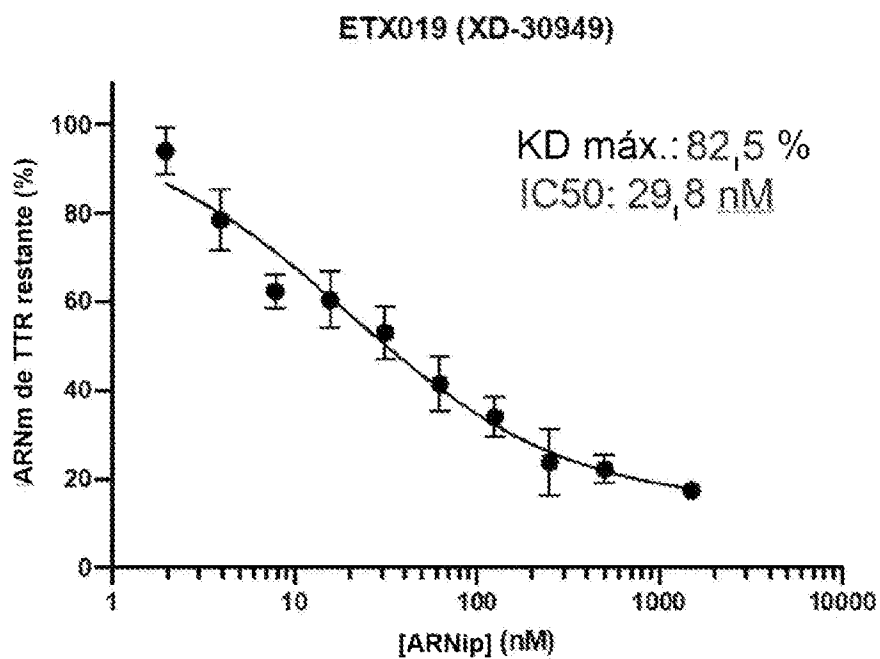


Figura 10B

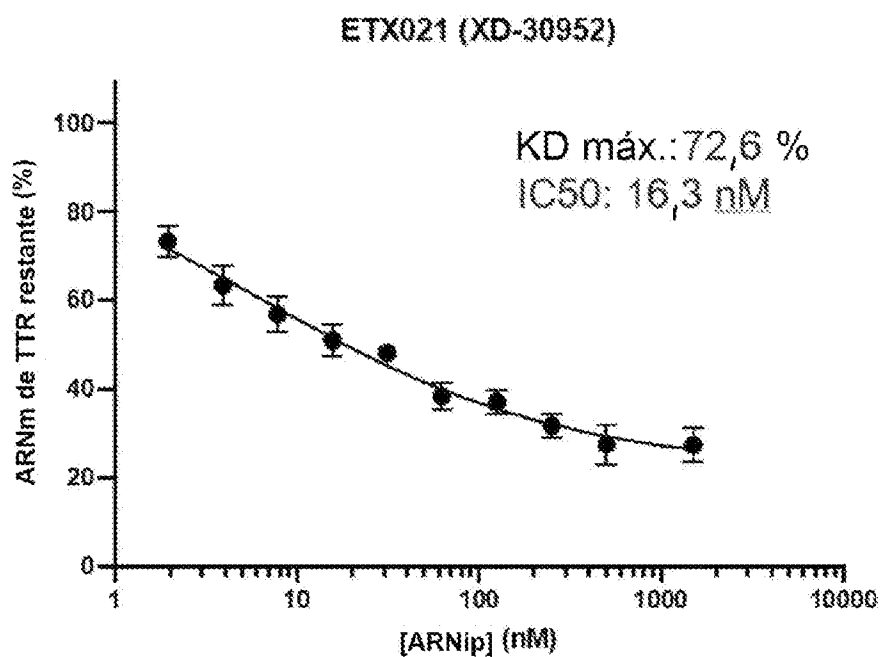


Figura 10C

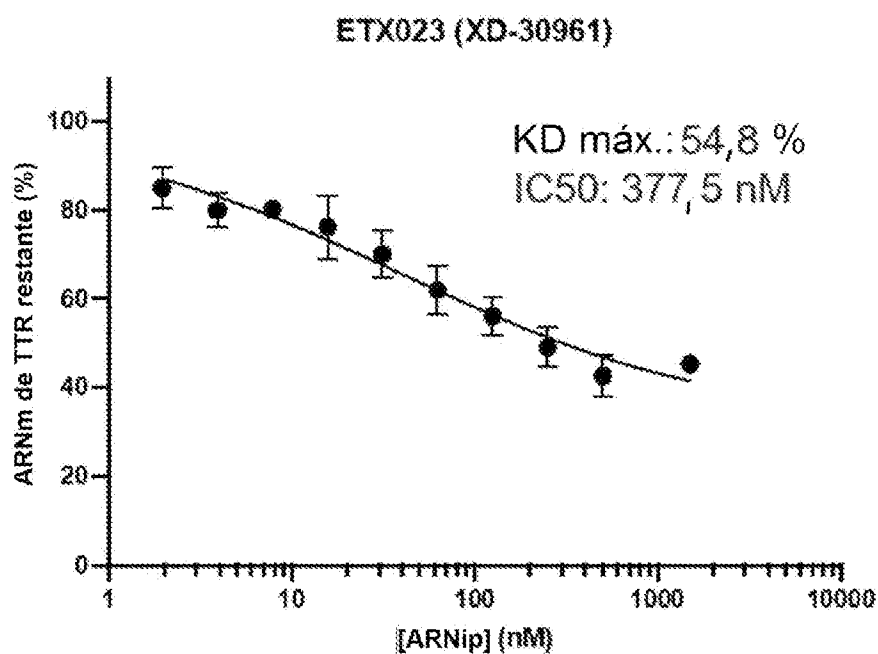


Figura 10D

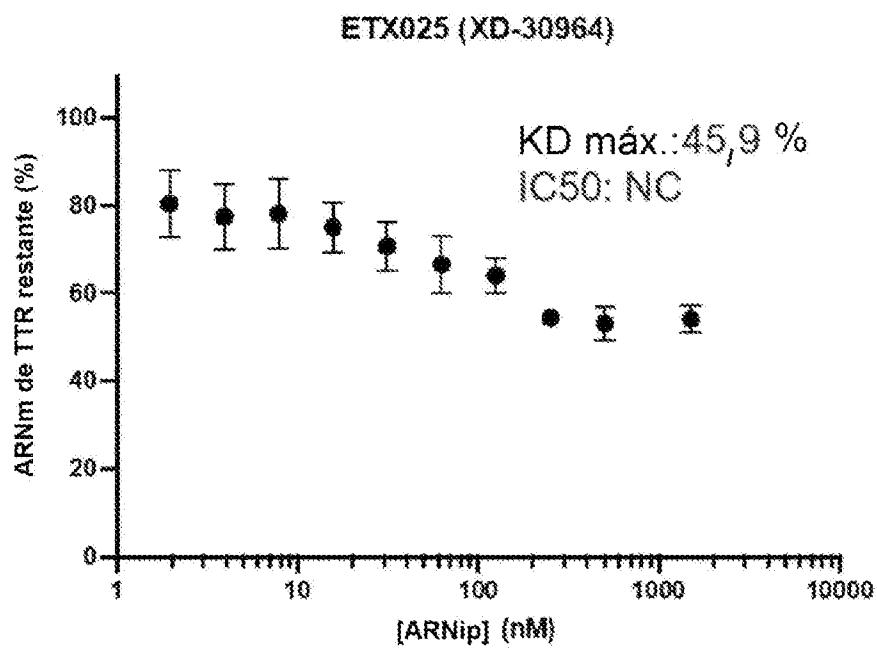


Figura 11

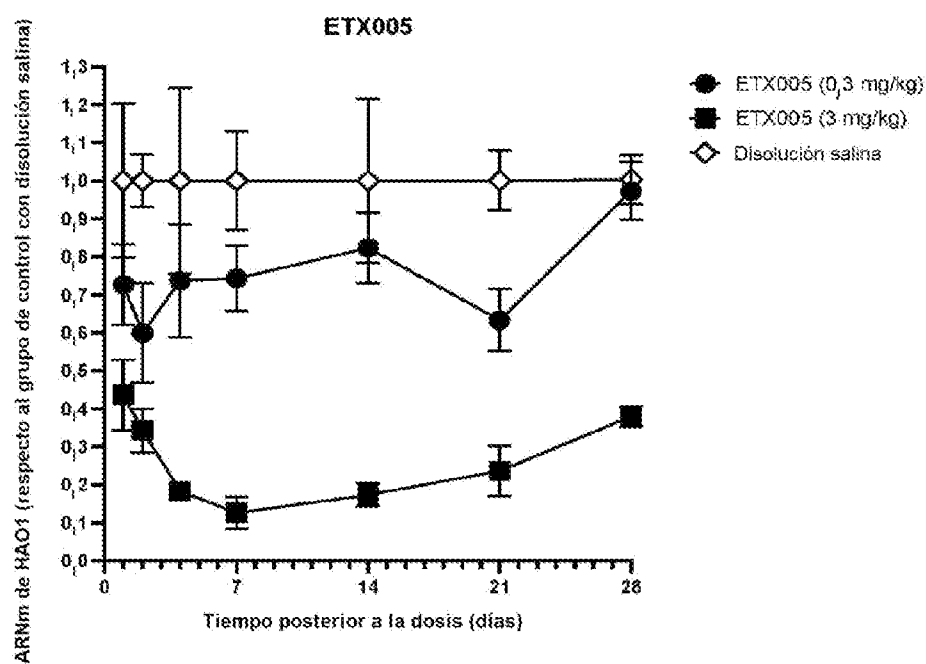


Figura 12

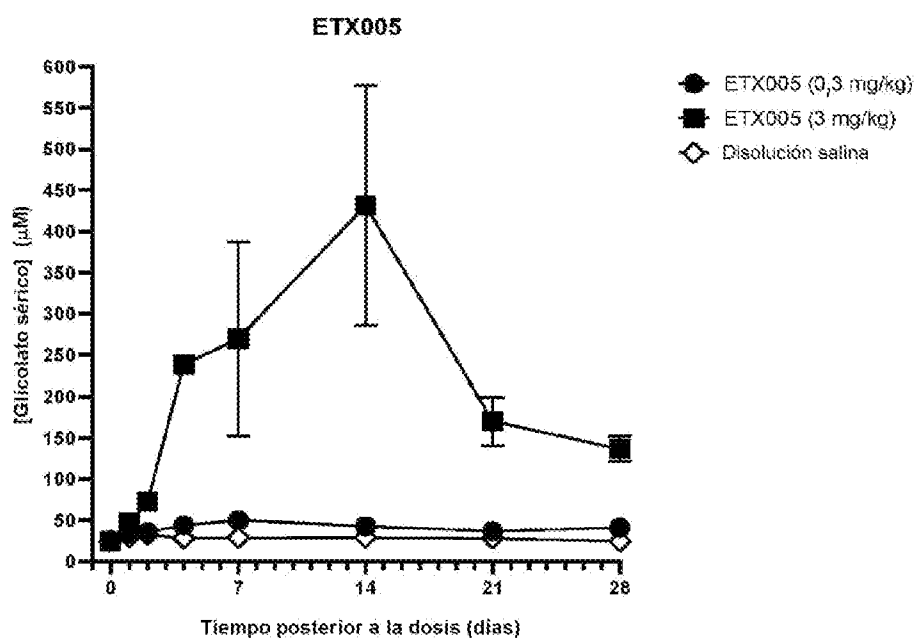


Figura 13

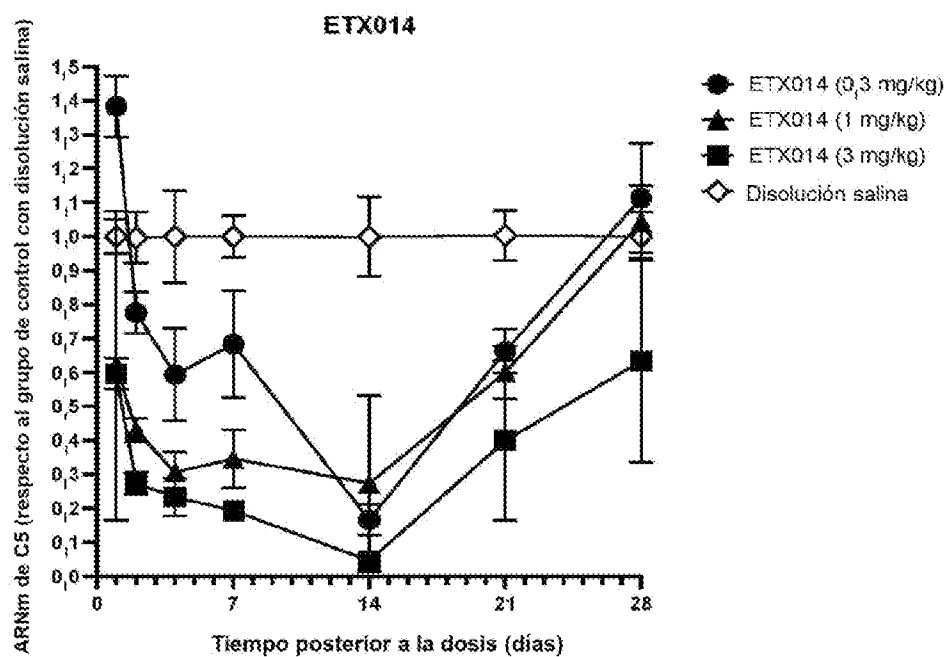


Figura 14

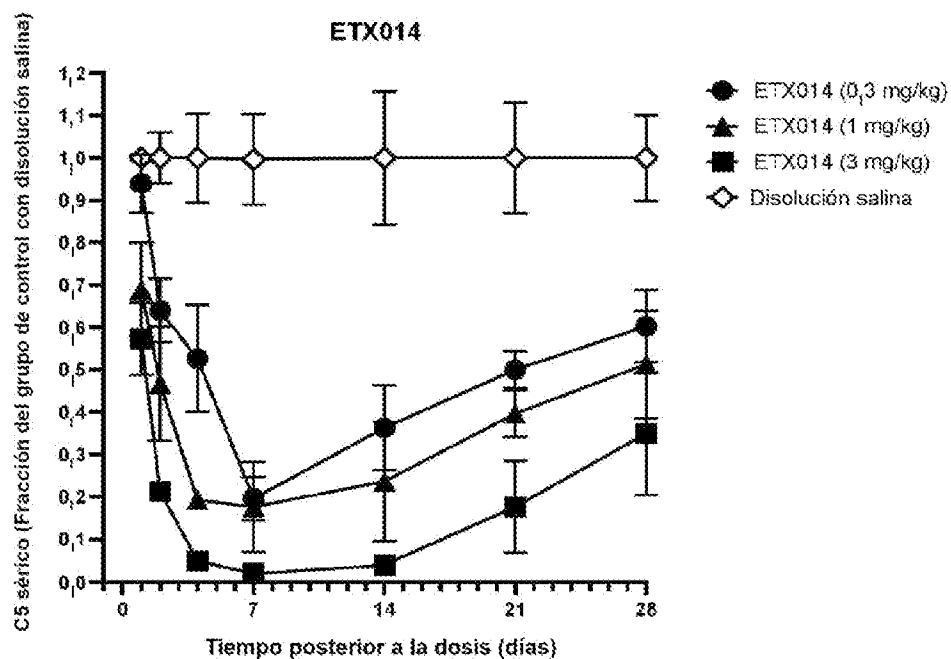


Figura 15

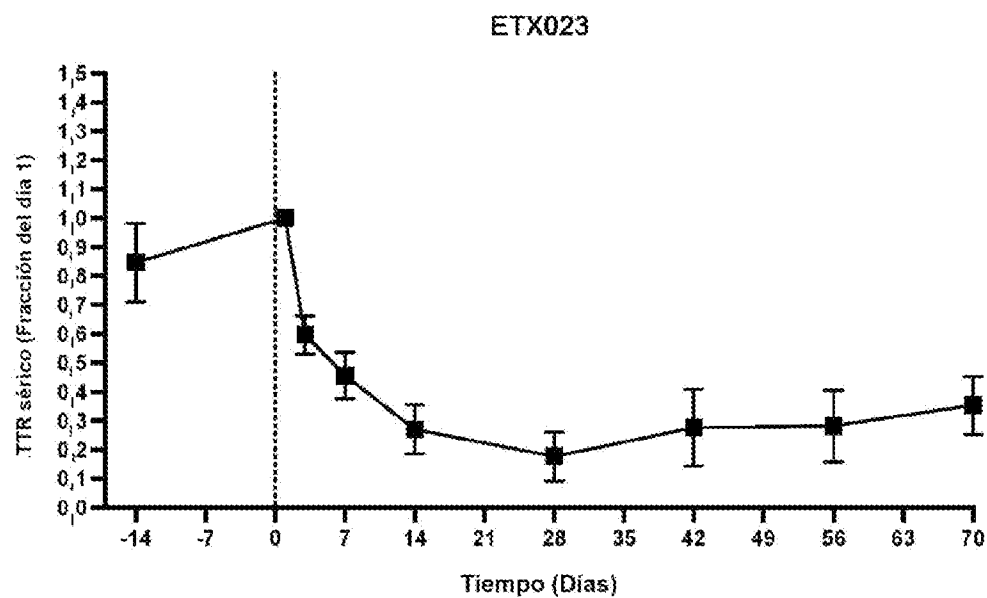


Figura 16

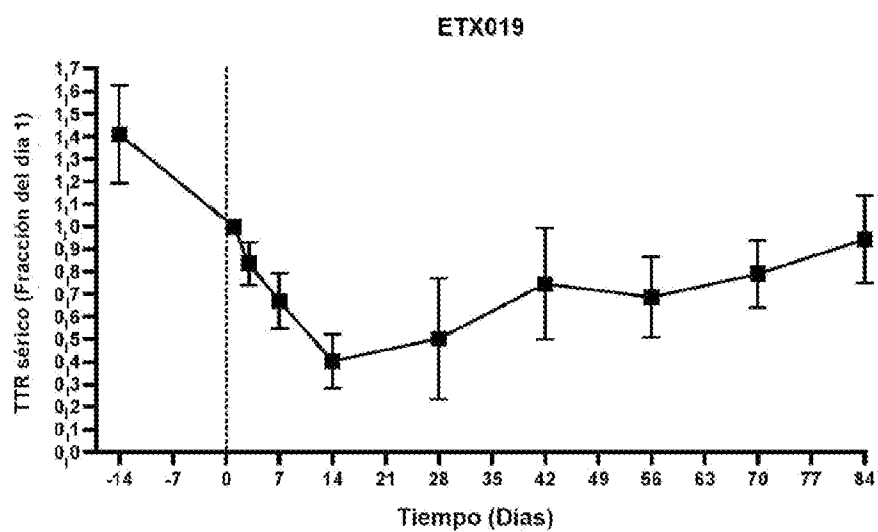


Figura 17

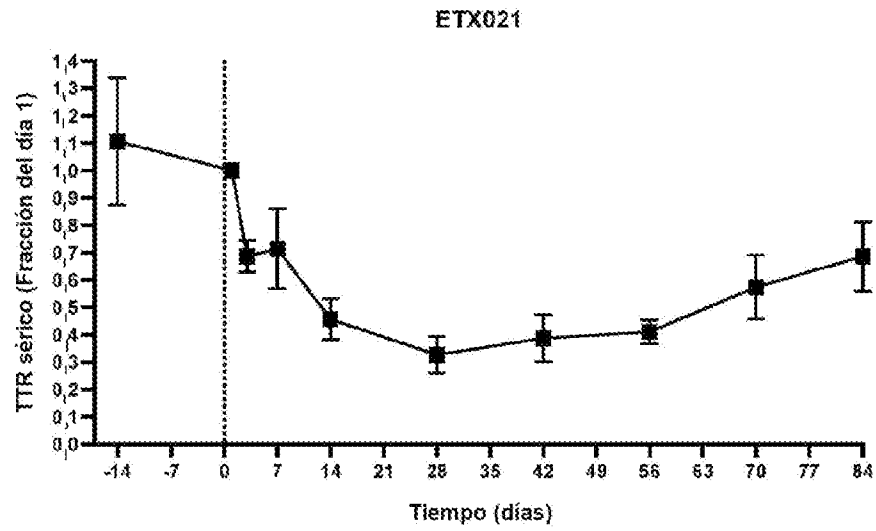


Figura 18a

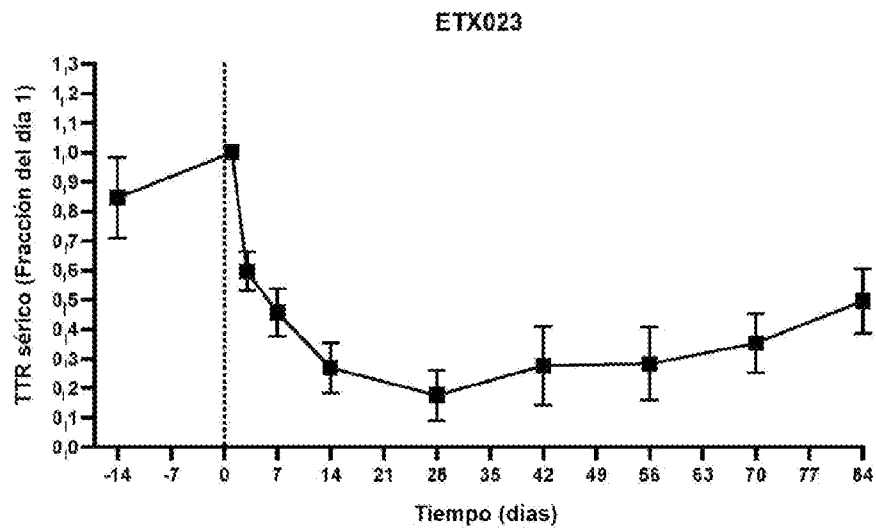


Figura 18b

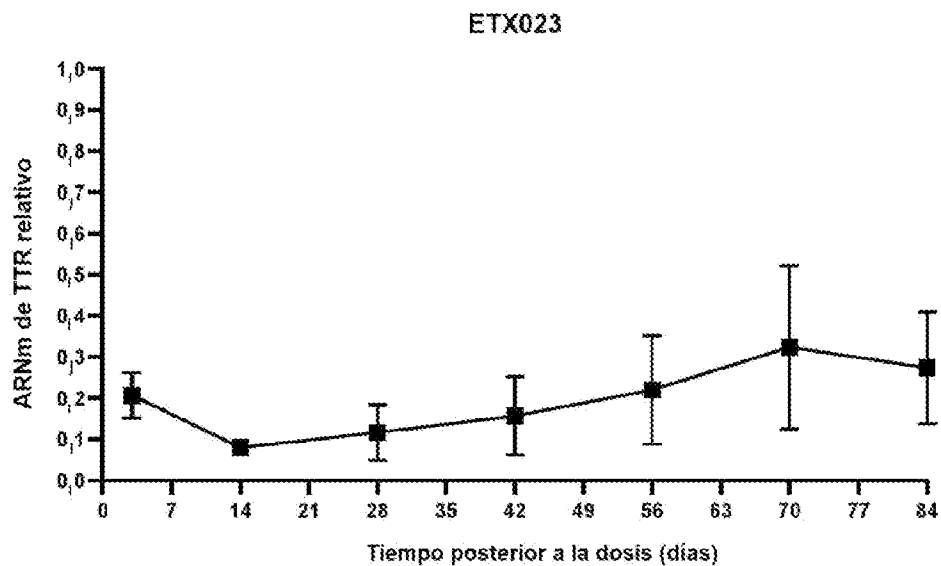


Figura 18c

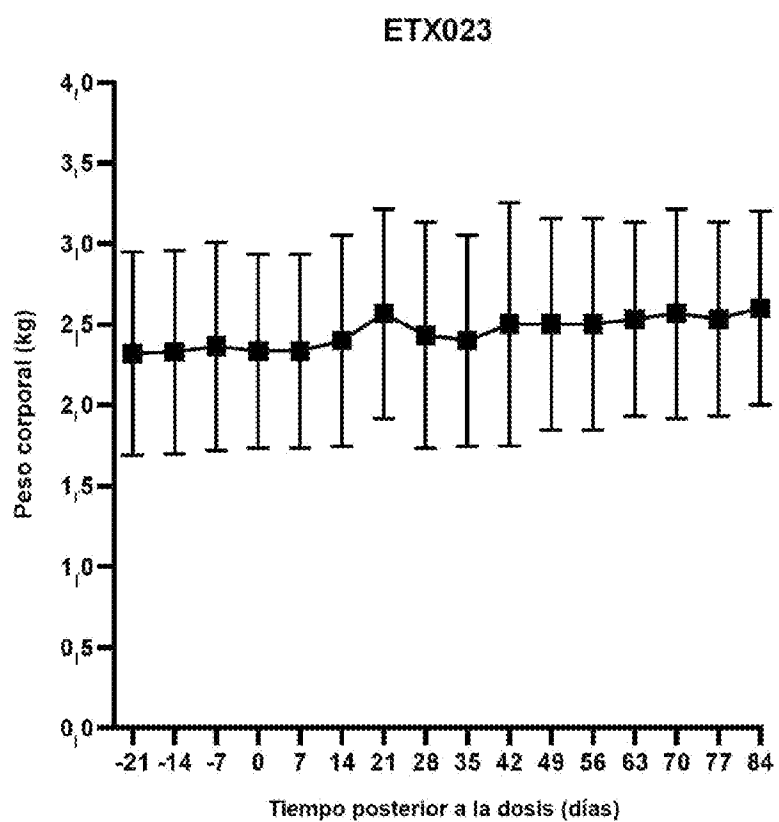


Figura 18d

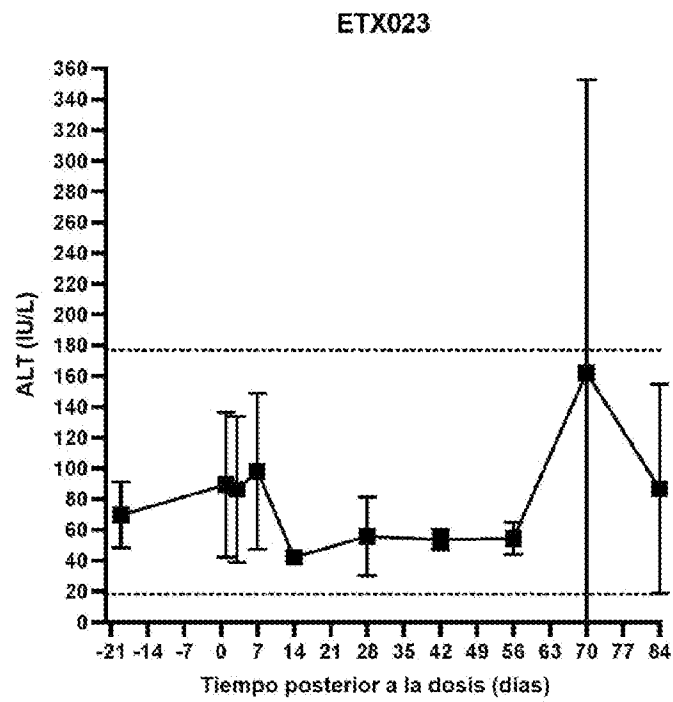


Figura 18e

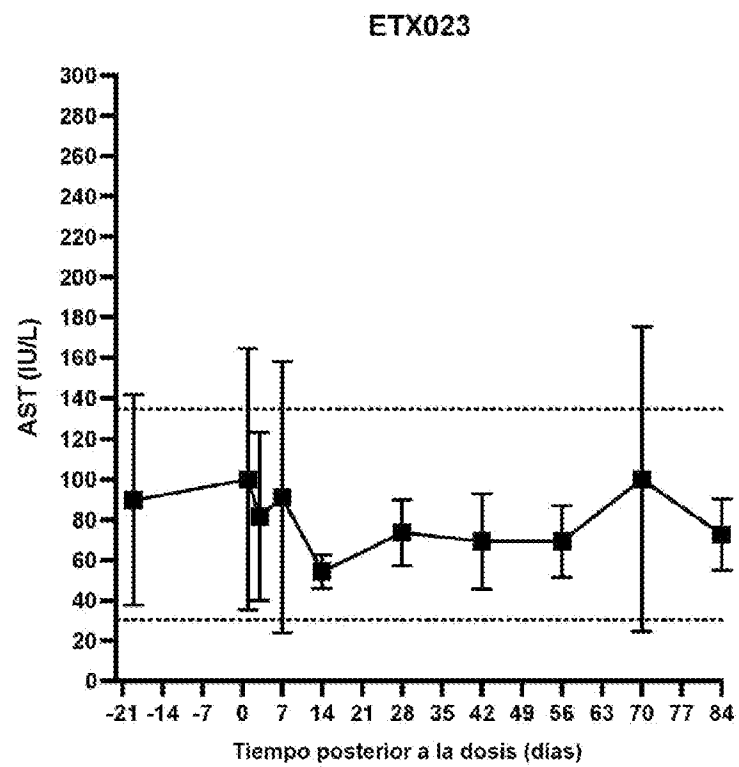


Figura 19

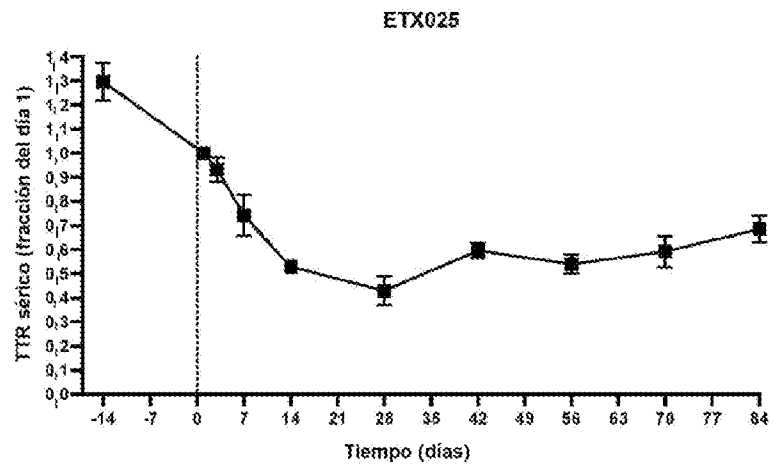


Figura 20

Unión 3'-GalNAc 1a

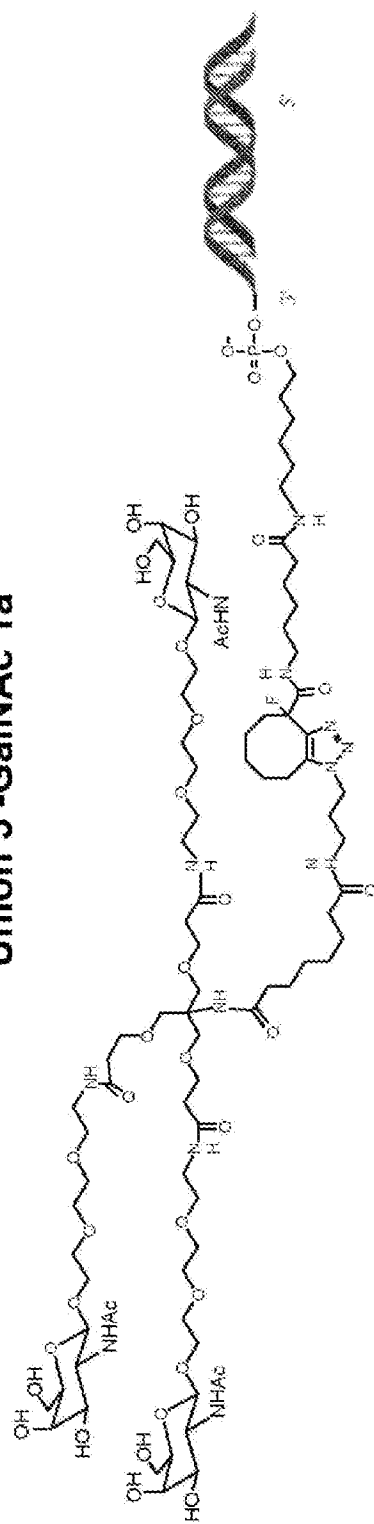


Figura 21

Unión 5'-GalNAc 1b

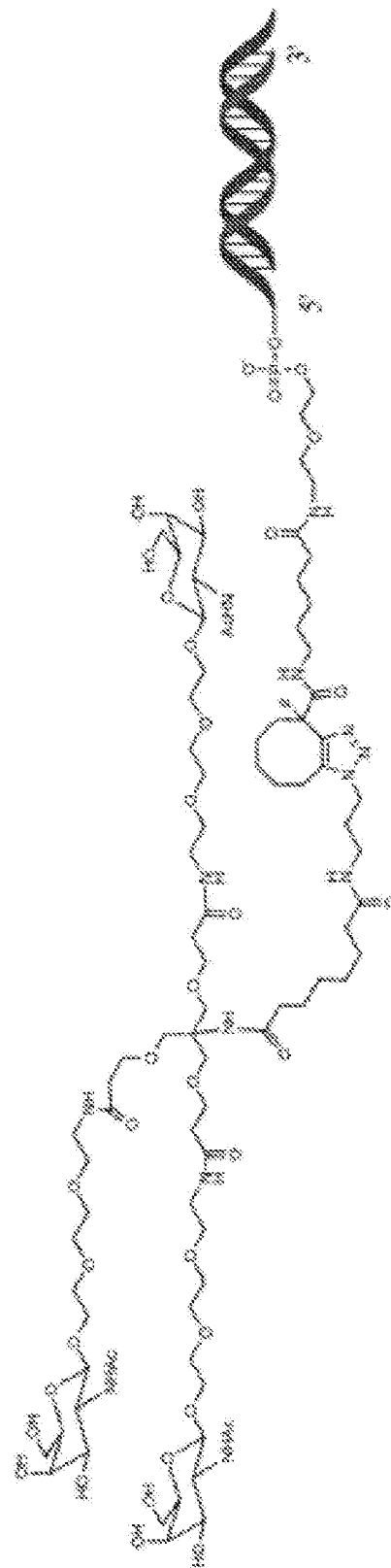


Figura 22

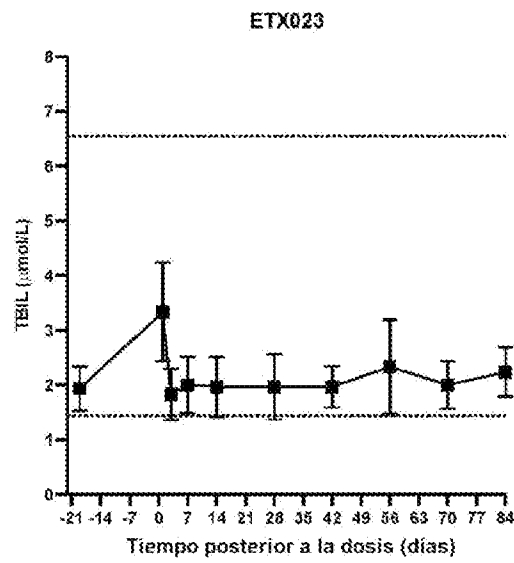


Figura 23

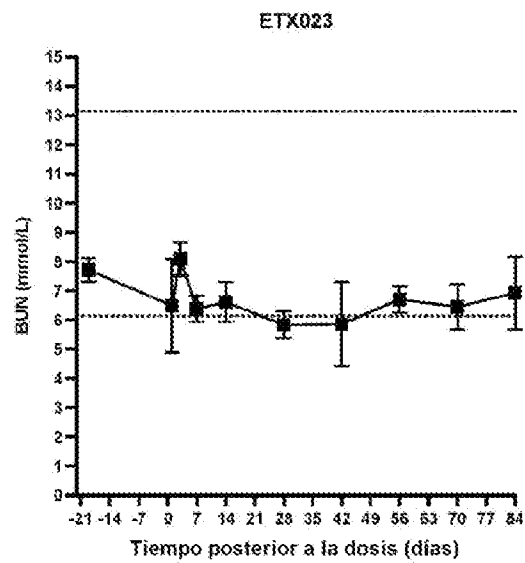


Figura 24

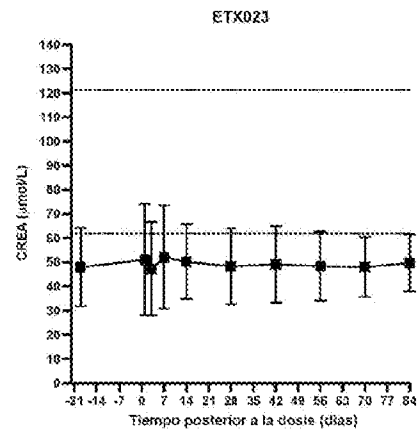


Figura 25A

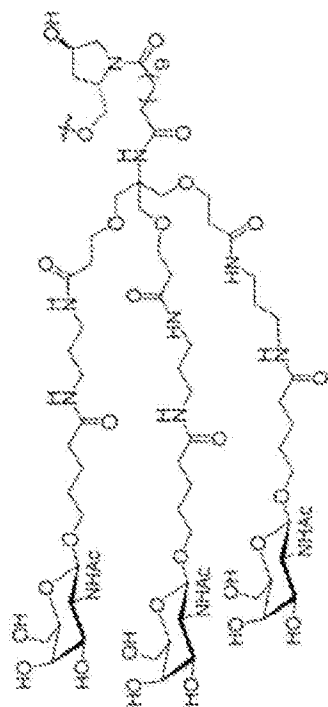


Figura 25B

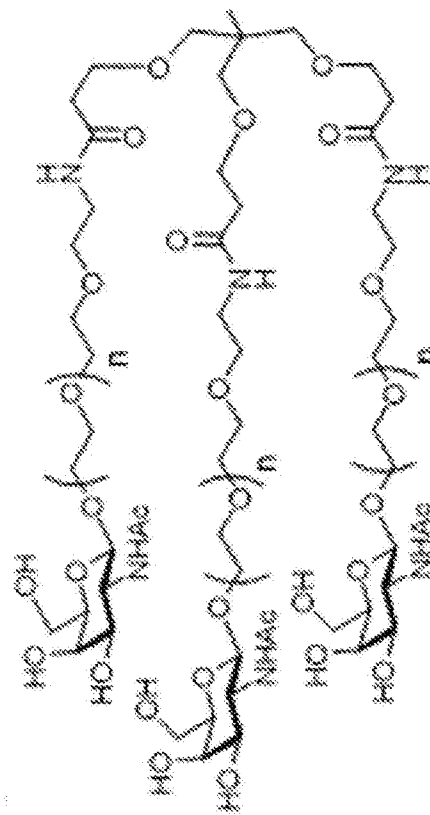


Figura 26A

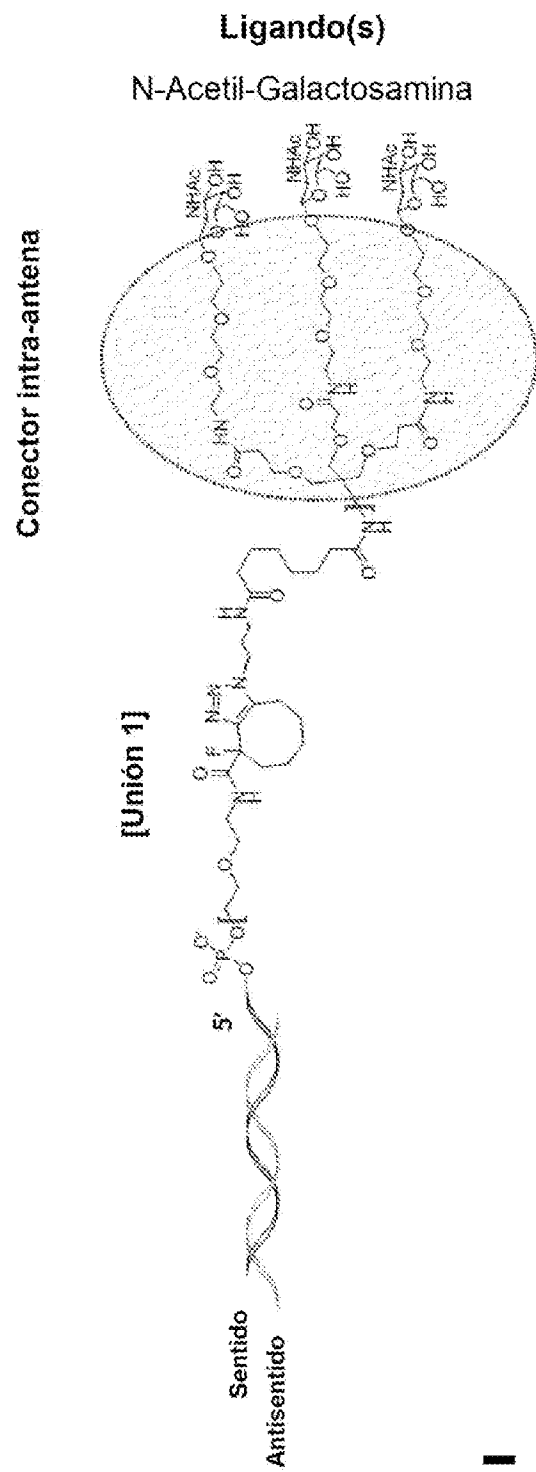


Figura 26B

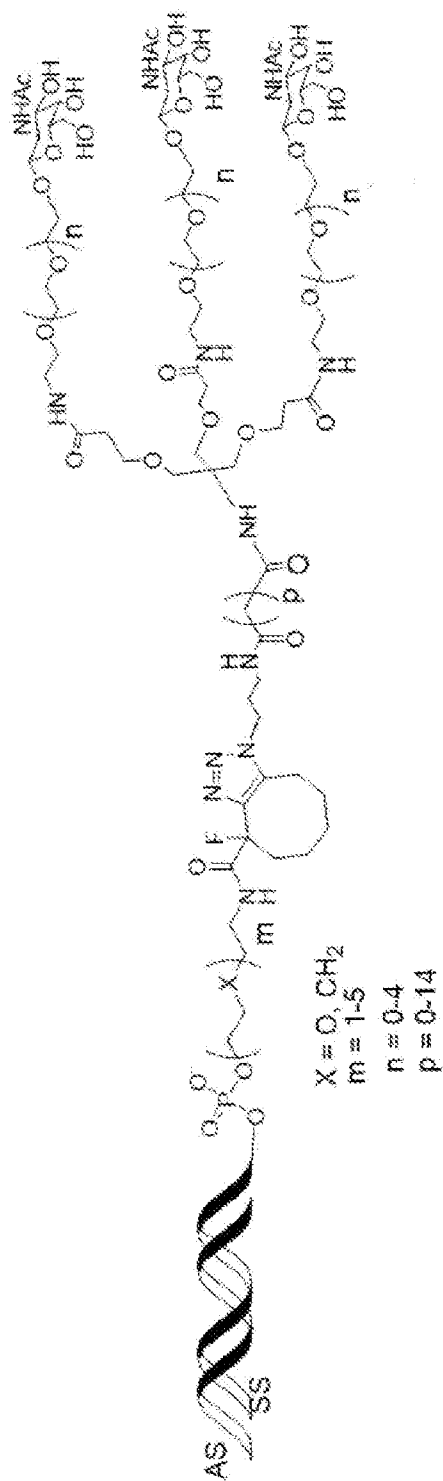


Fig 26C

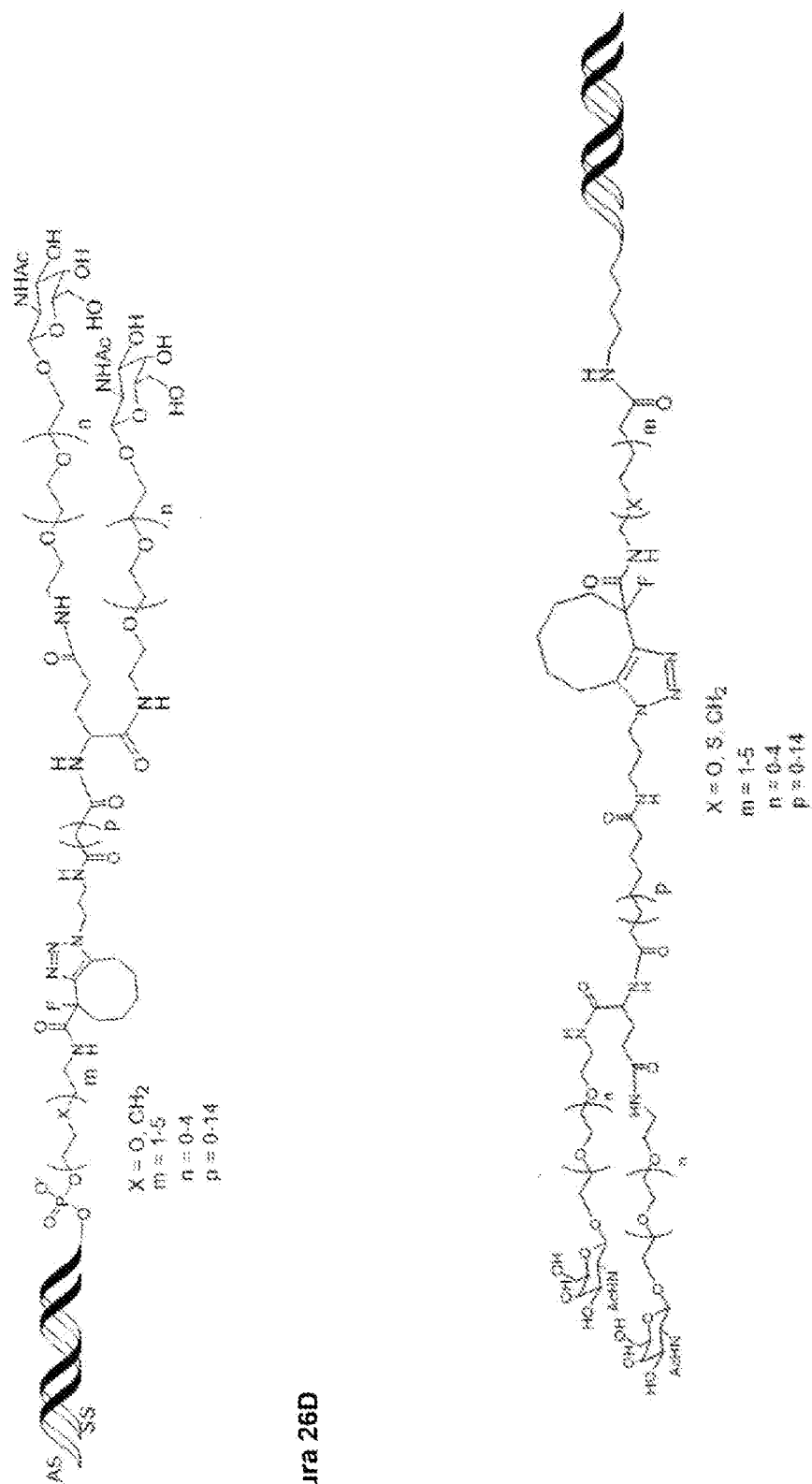


Figura 26D

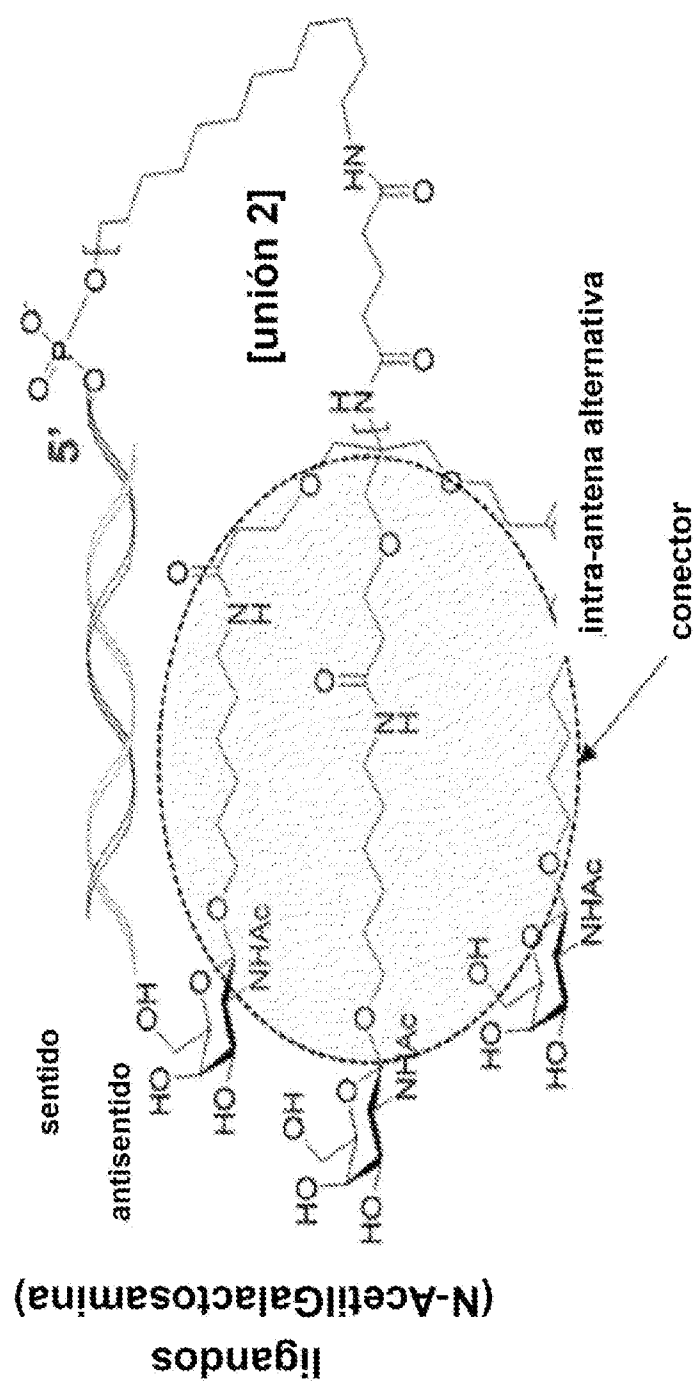


Figura 27A

Figura 27B

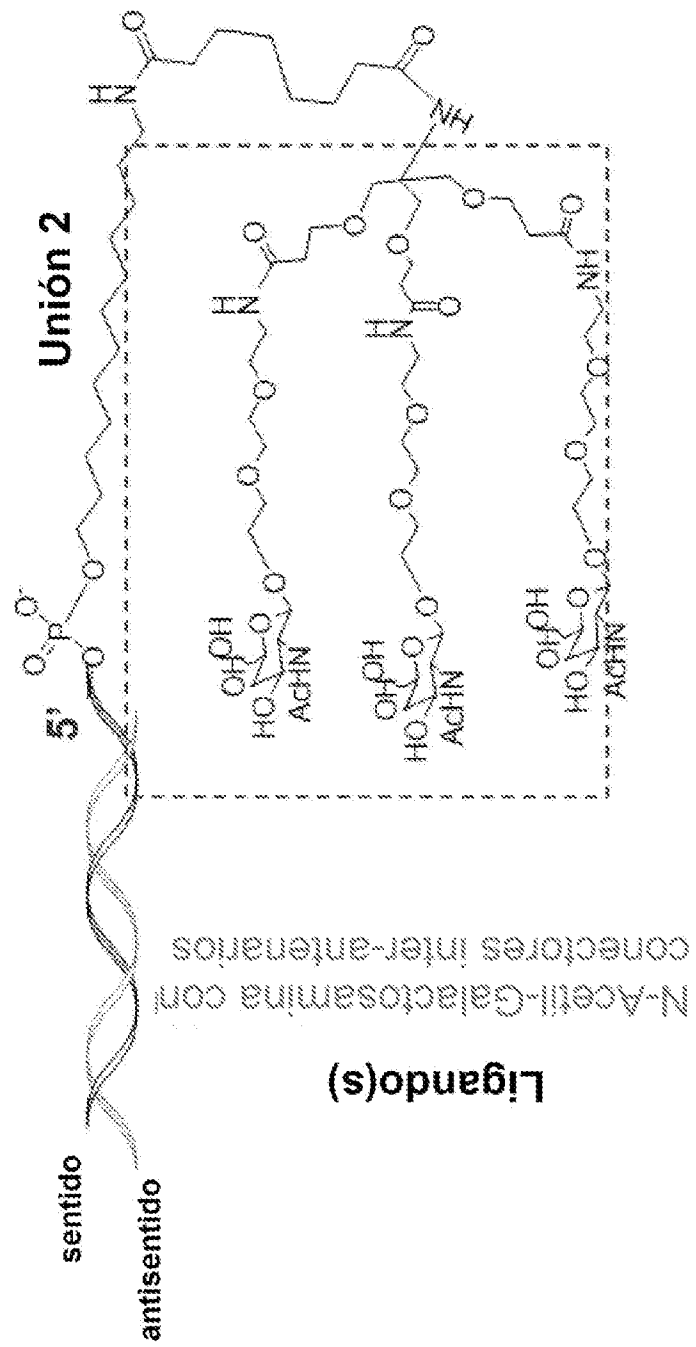


Figura 27C

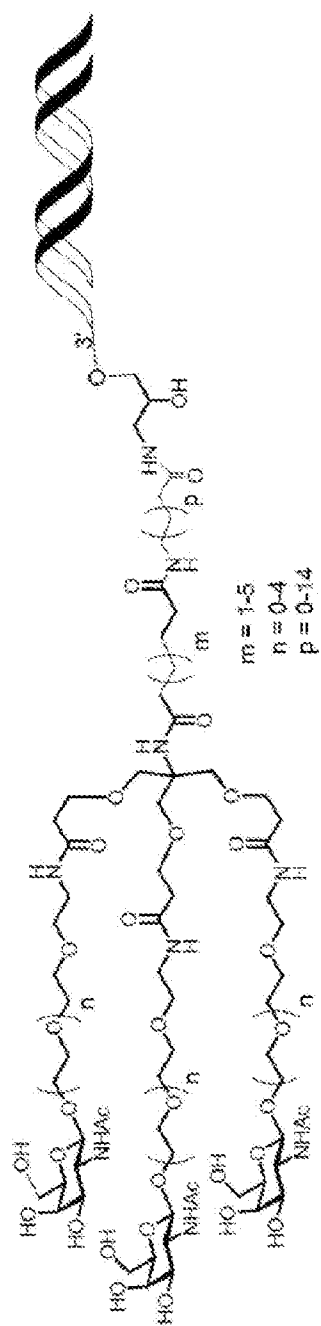


Figura 27D

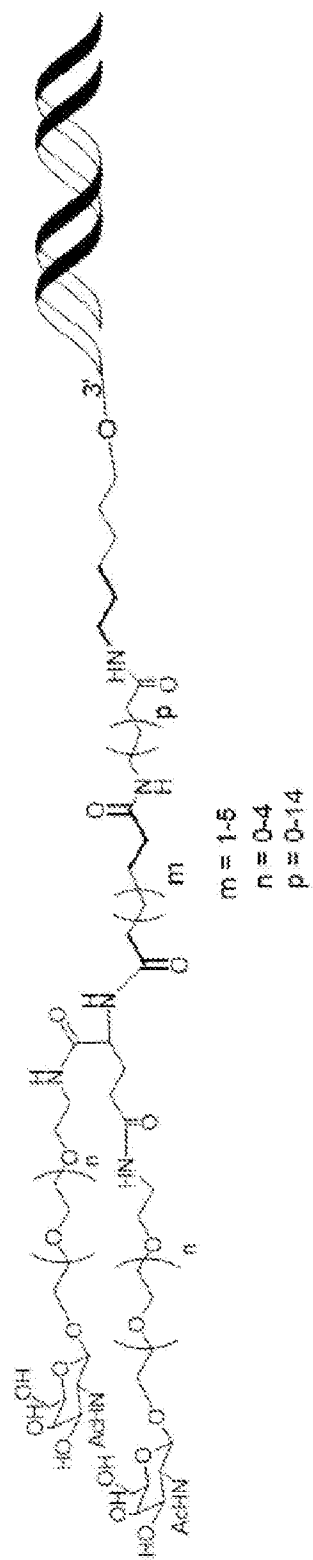
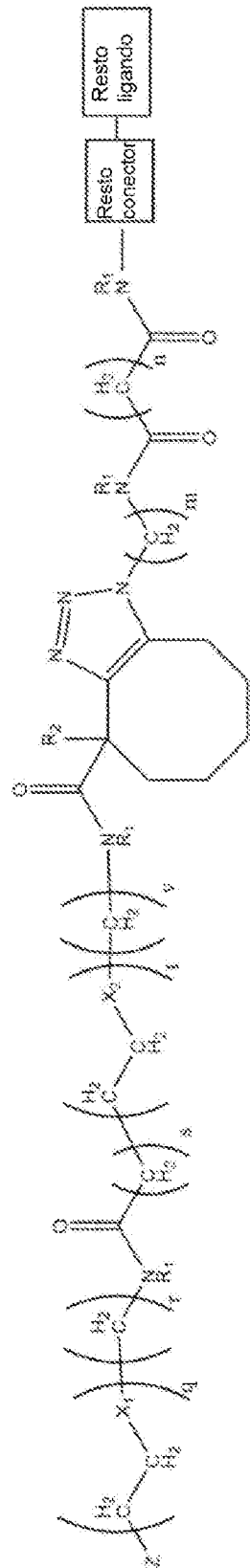
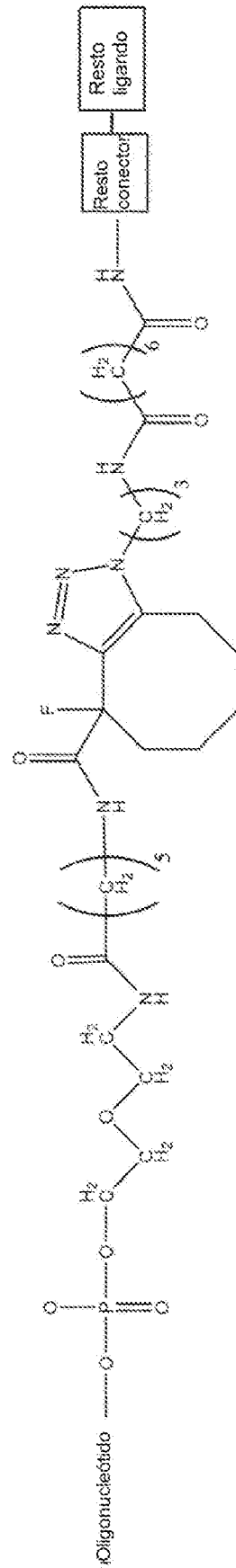


Figura 28

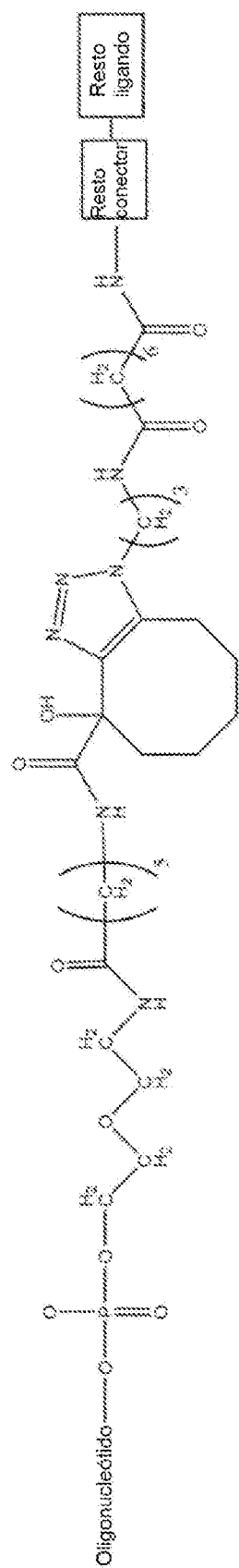


Formula (1)

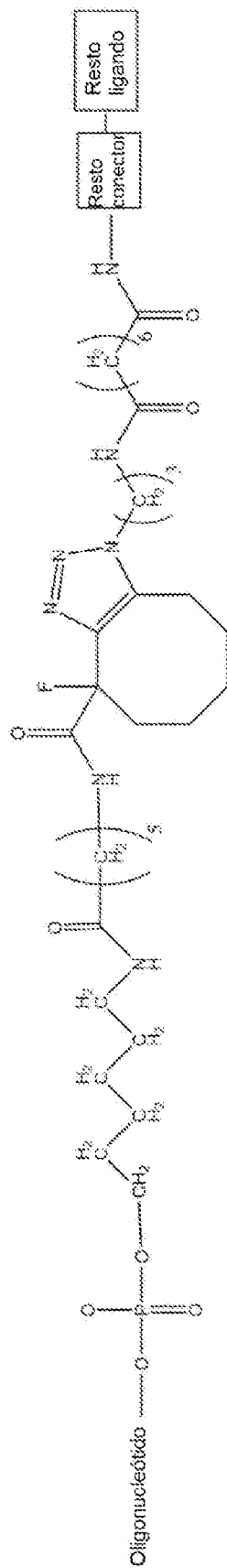


Fórmula (II)

Figura 28 (continuación)

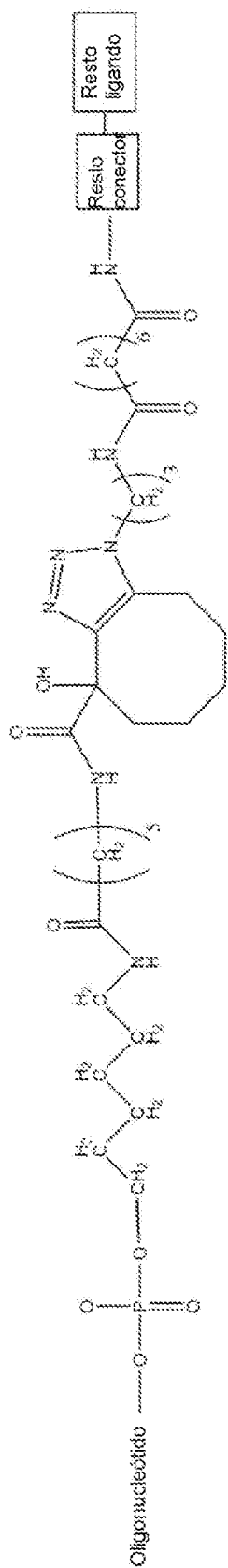


Fórmula (III)

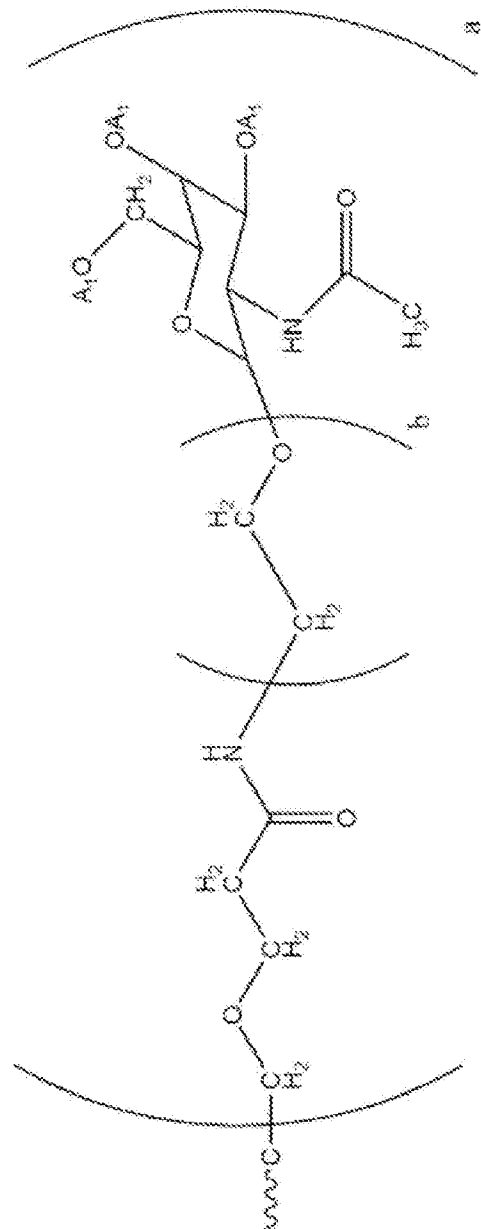


Fórmula (IV)

Figura 28 (continuación)

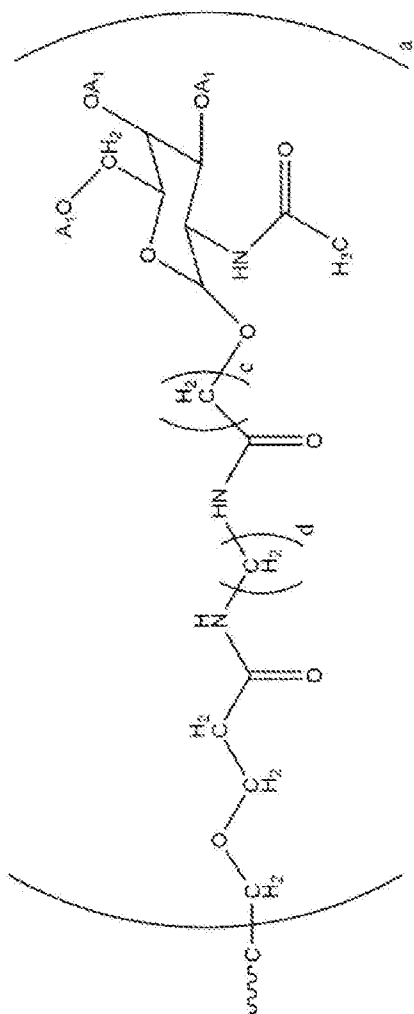


Fórmula (V)

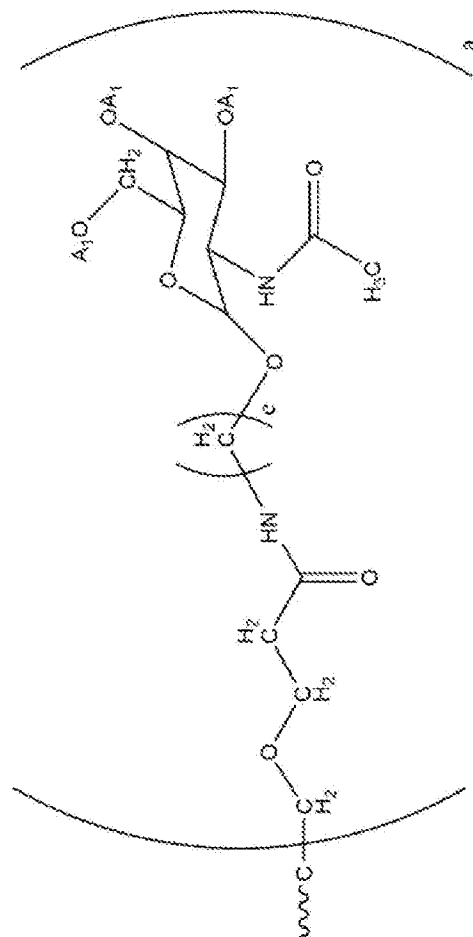


Fórmula (Via)

Figura 28 (continuación)



Fórmula (Vib)



Fórmula (Vlc)

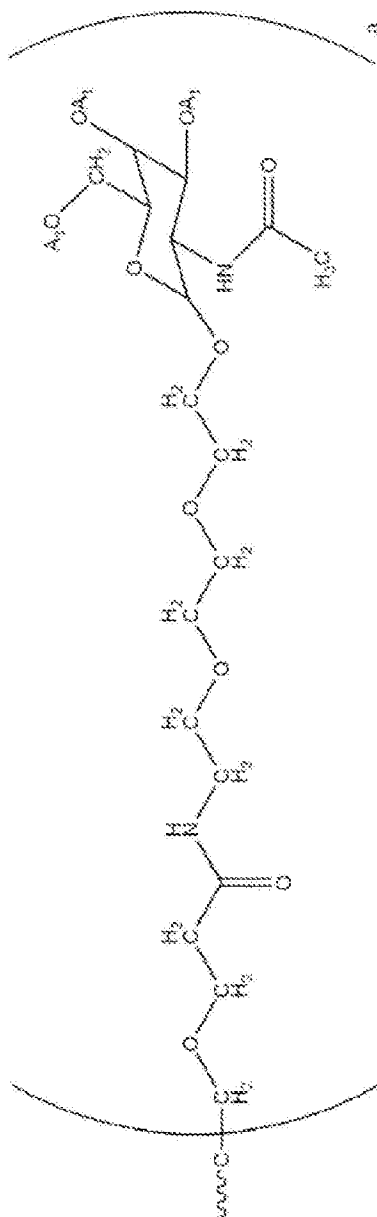
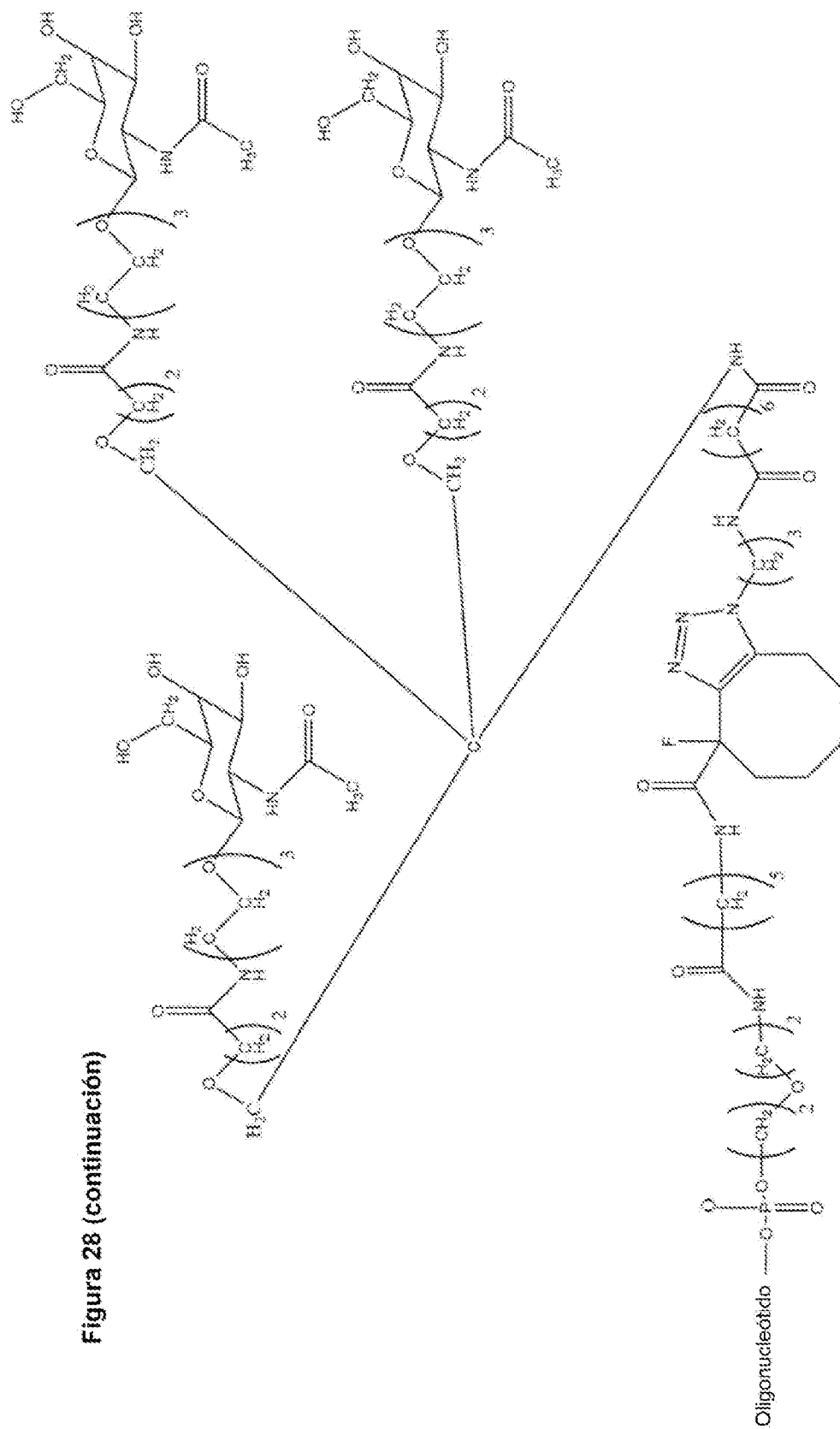


Figura 28 (continuación)

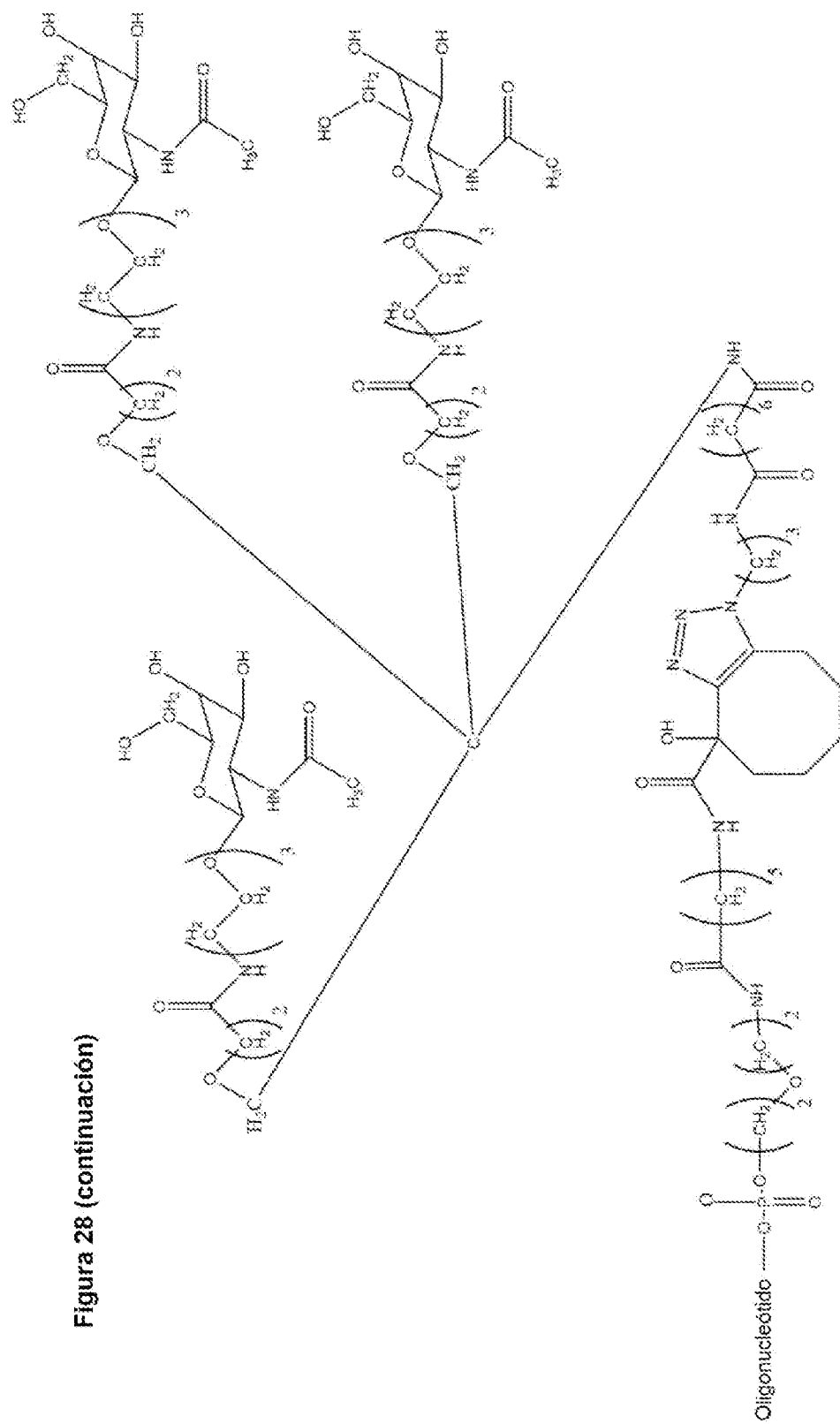
Fórmula (VII)

Figura 28 (continuación)



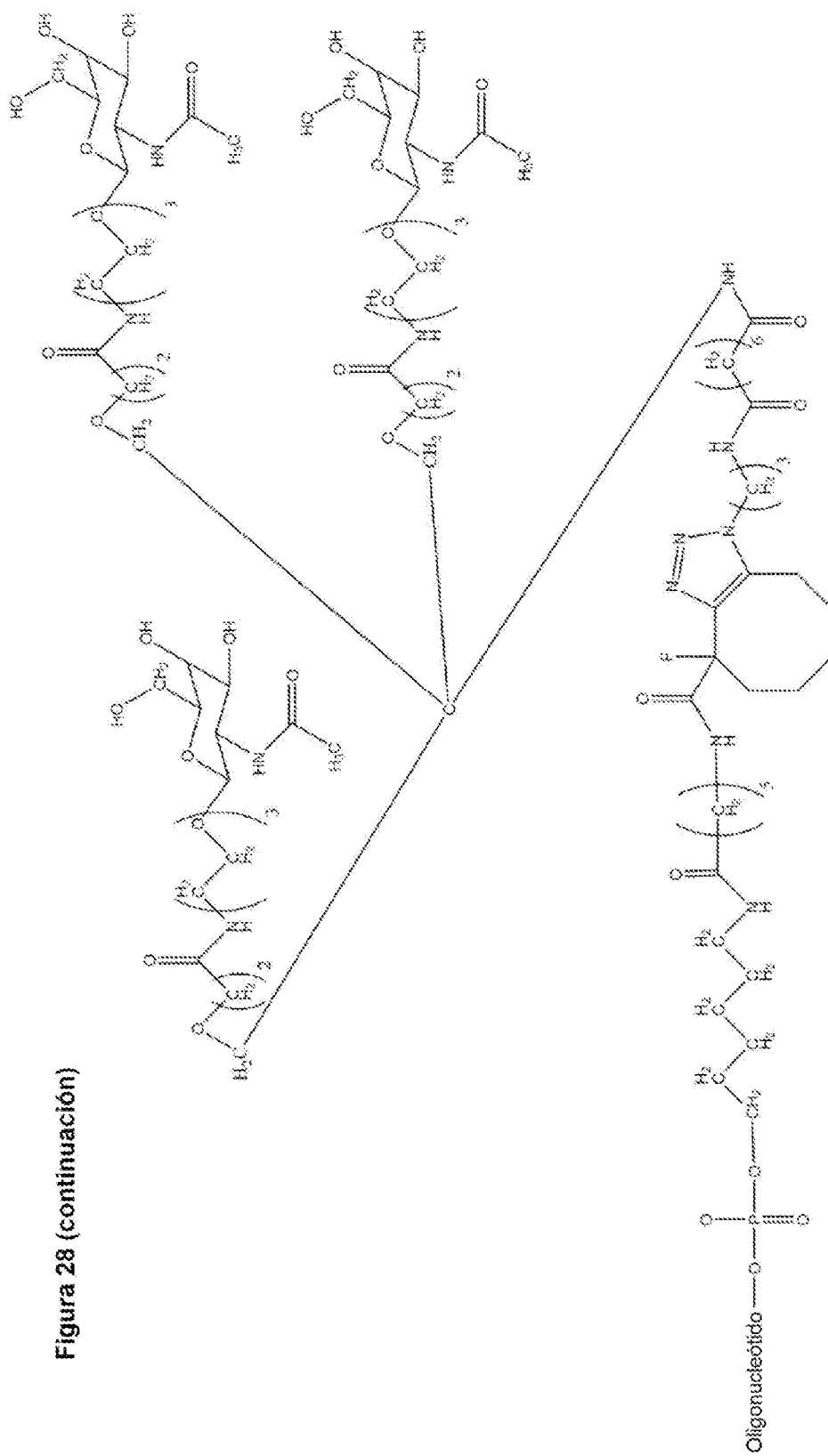
Fórmula (VIII)

Figura 28 (continuación)



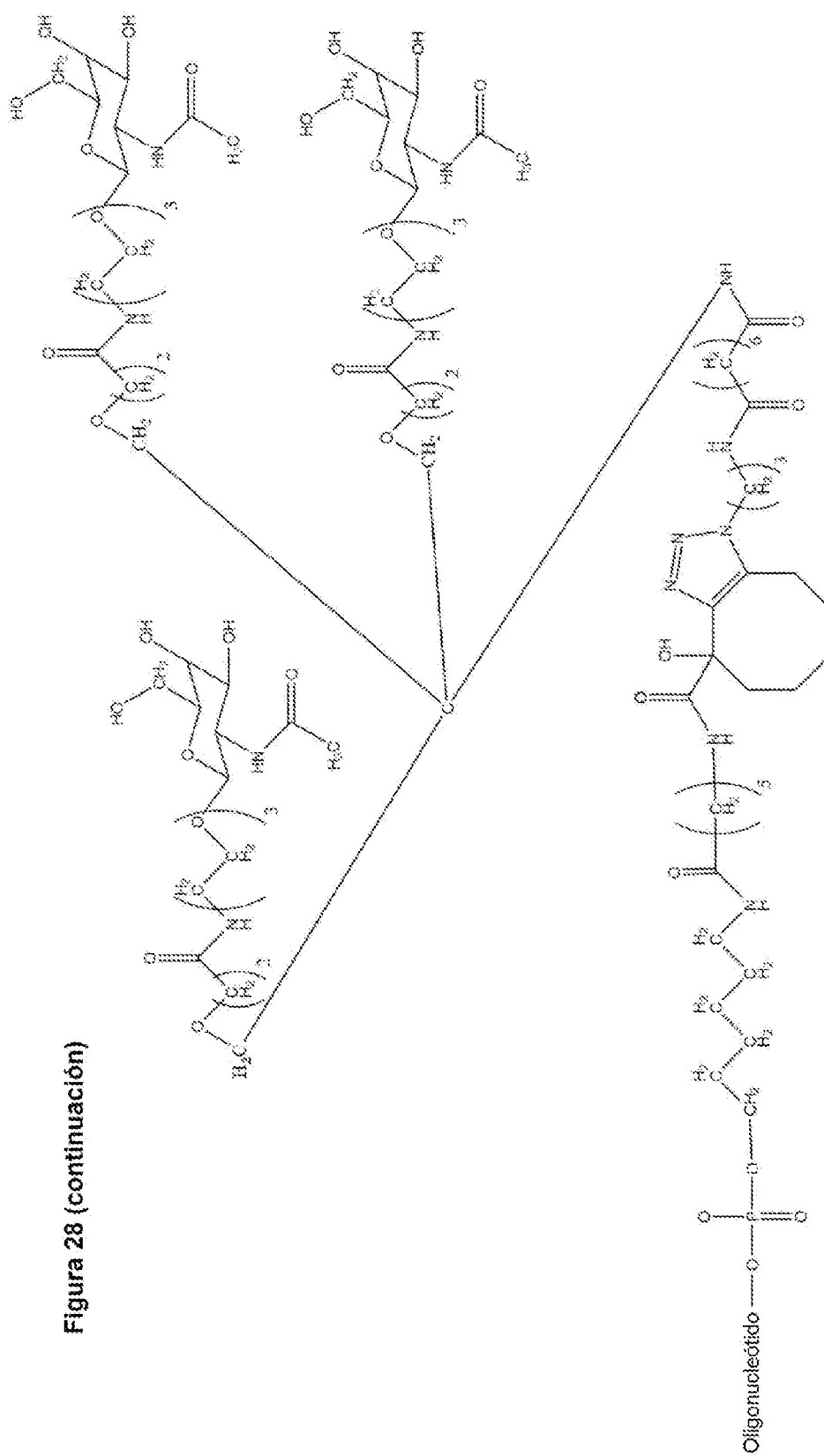
Fórmula (IX)

Figura 28 (continuación)



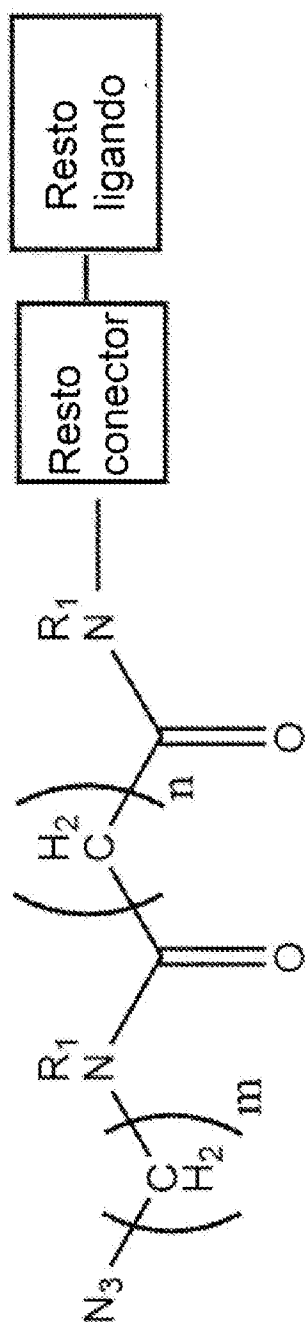
Fórmula (X)

Figura 28 (continuación)

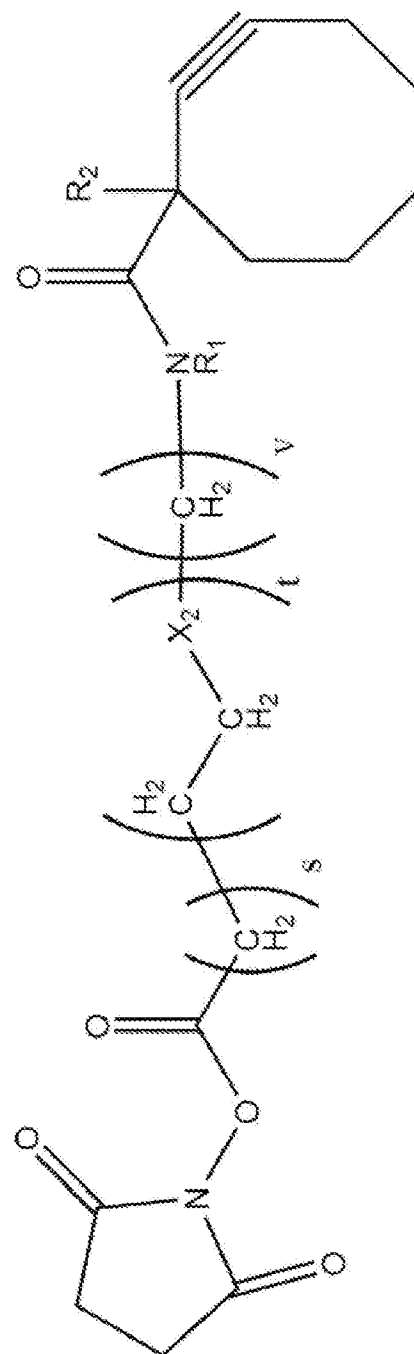


Fórmula (Xi)

Figura 28 (continuación)

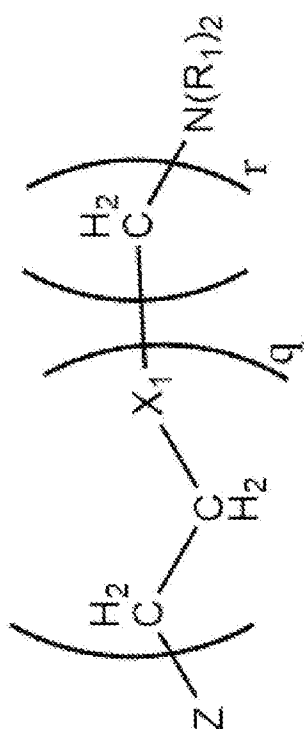


Fórmula (XIII)

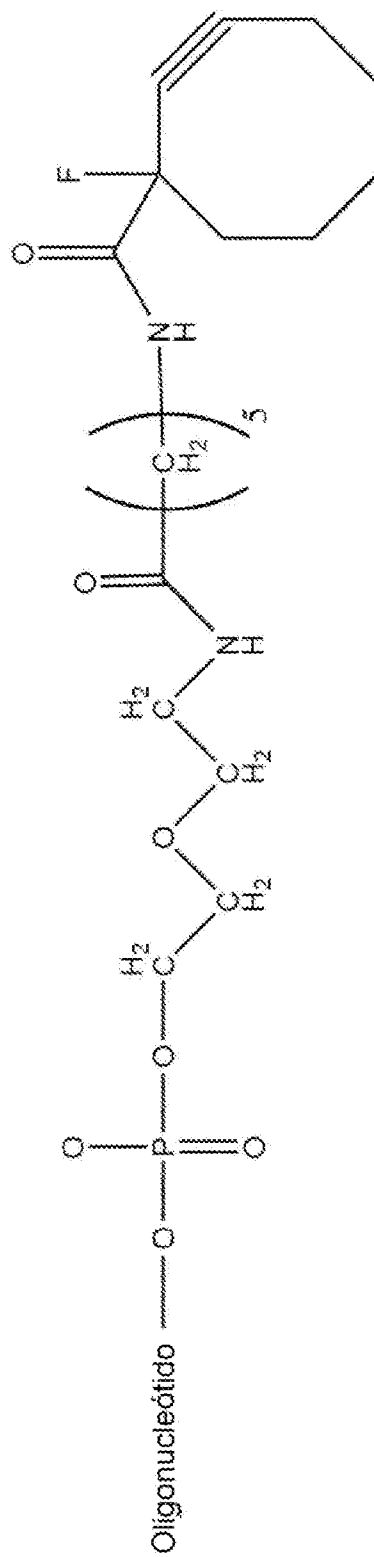


Fórmula (XIV)

Figura 28 (continuación)

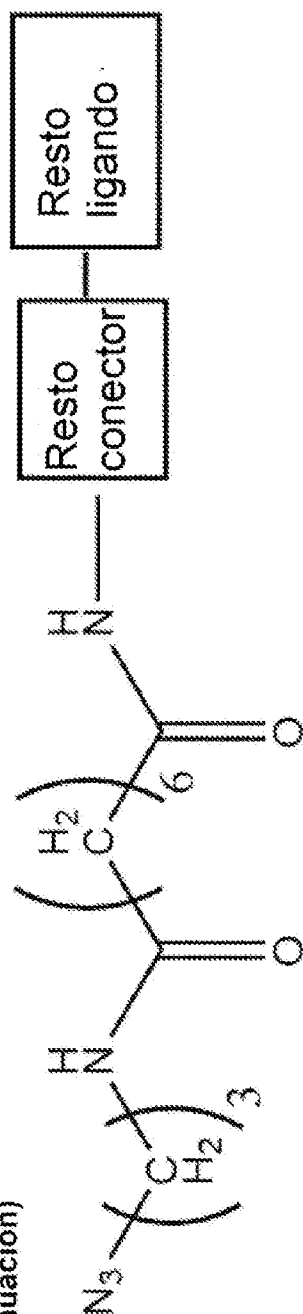


Fórmula (XV)

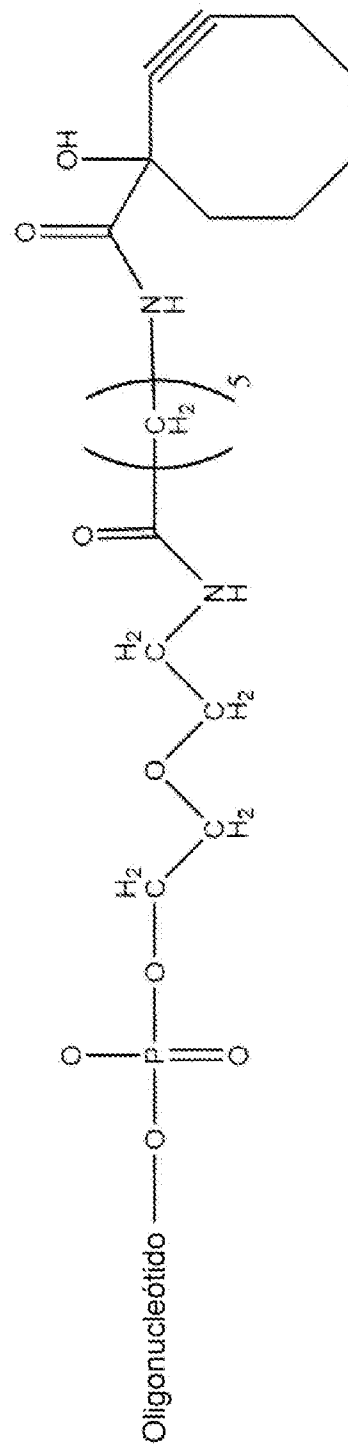


Fórmula (XIIa)

Figura 28 (continuación)

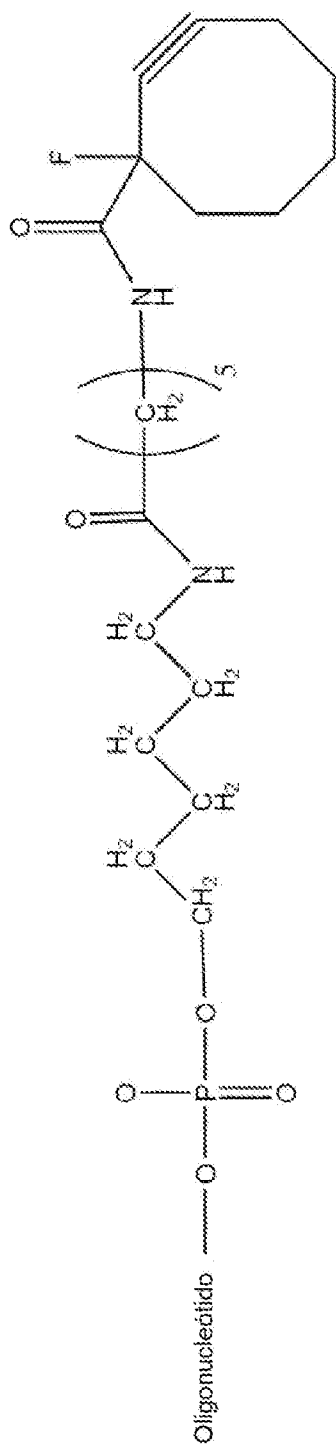


Fórmula (XIIa)

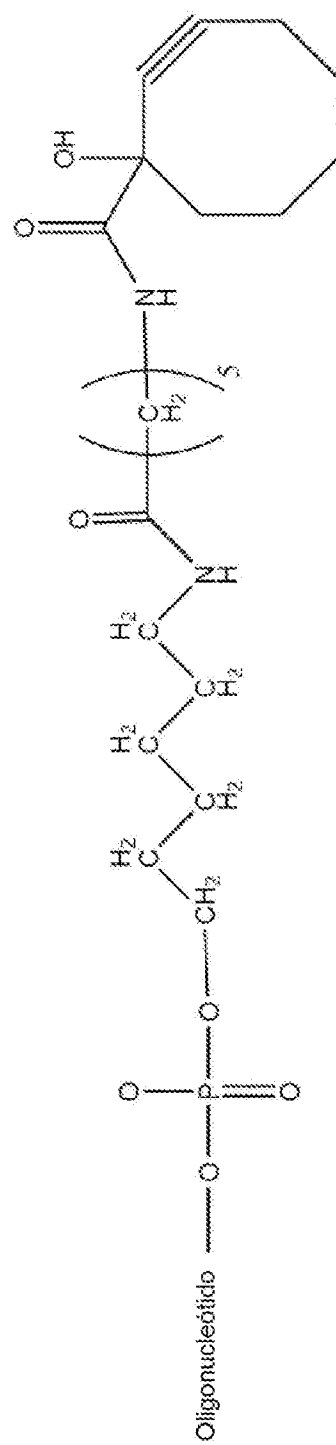


Fórmula (XIIb)

Figura 28 (continuación)



Fórmula (XlIc)



Fórmula (XlId)

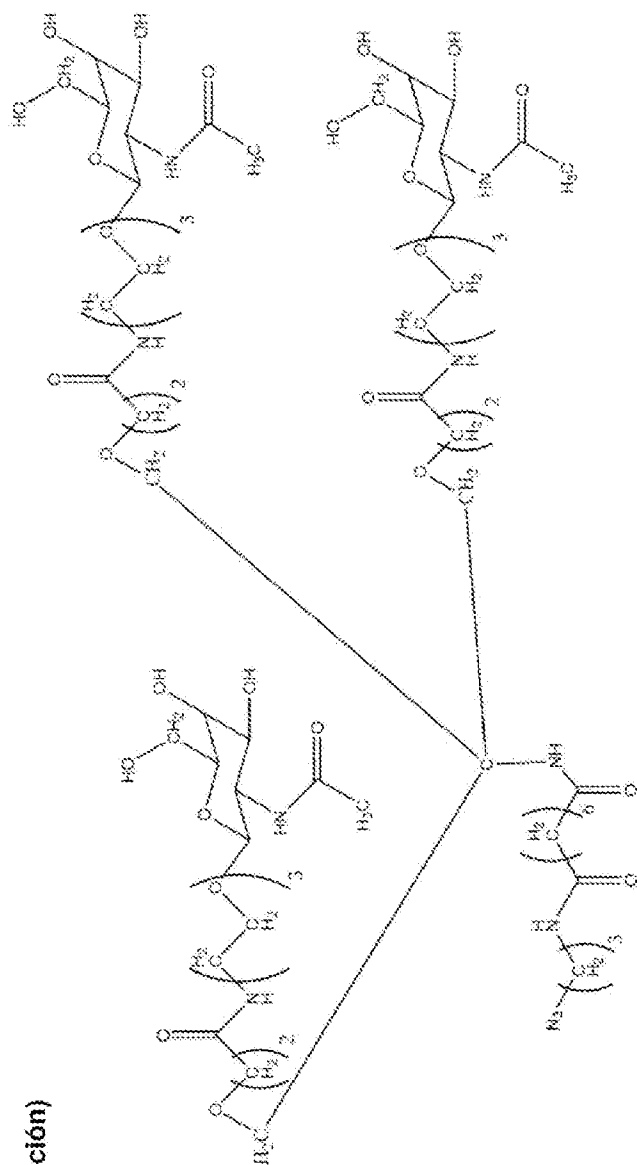
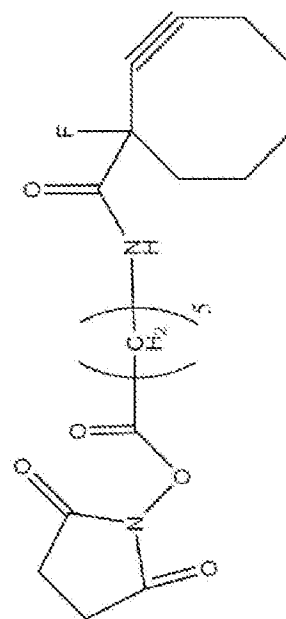


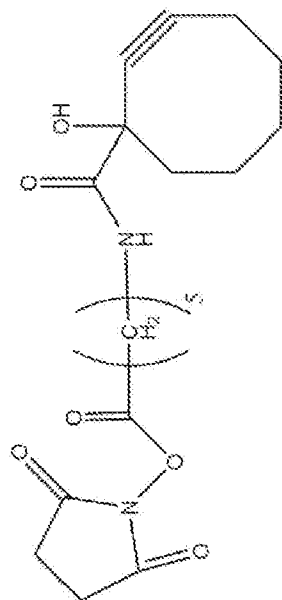
Figura 28 (continuación)

Fórmula (XIIIb)

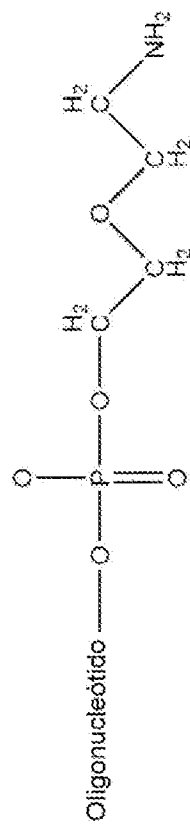


Fórmula (XIVa)

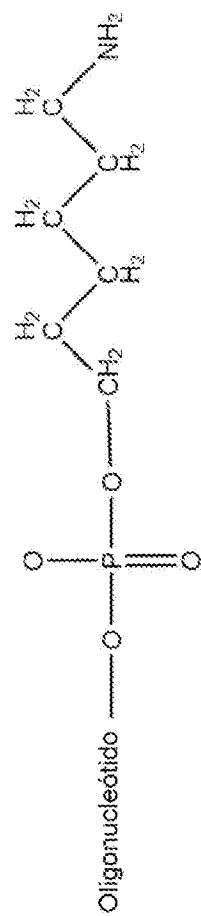
Figura 28 (continuación)



Fórmula (XIVb)



Fórmula (XVa)



Fórmula (XVb)

Figura 29: constructos de direccionamiento a HAO1

Figura 29a:



Figura 29b:



Figura 30: constructos de direccionamiento a C5

Figura 30a:



Figura 30b:



Figura 31: constructos de direccionamiento a TTR

Figura 31a:



Figura 31b:

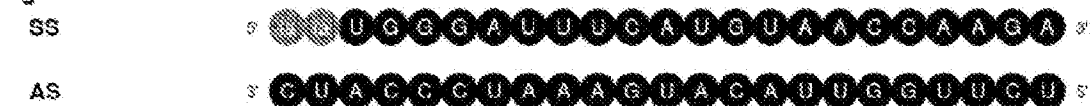


Figura 32

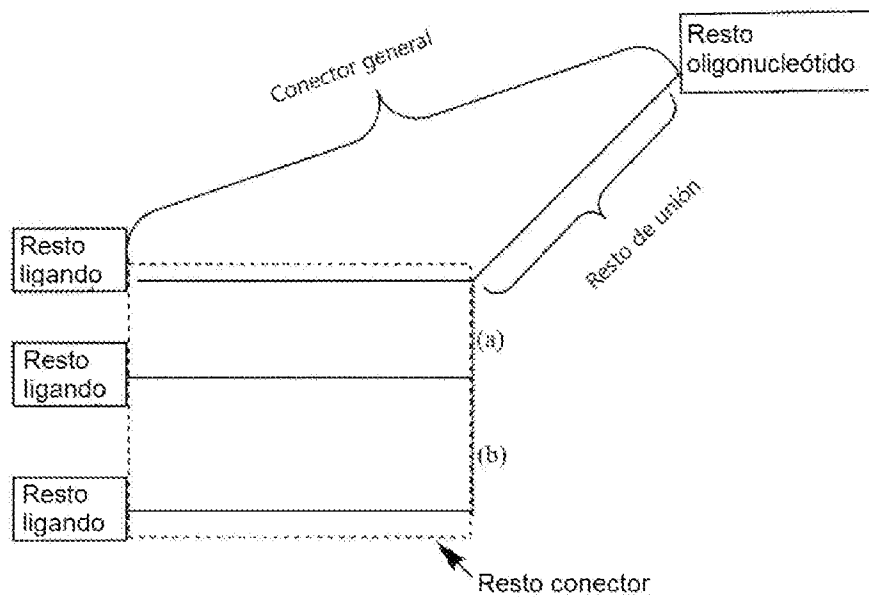


Figura 33

