

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 967 530**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/7105** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013** **PCT/EP2013/072410**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014** **WO14064257**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013** **E 13783061 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2023** **EP 2911695**

54 Título: **Composiciones y métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante la administración selectiva de moléculas de oligonucleótidos a tipos específicos de neuronas**

30 Prioridad:

**26.10.2012 EP 12382414**

**26.10.2012 US 201261719284 P**

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

**30.04.2024**

73 Titular/es:

**PALOMO LIMITED (100.0%)**  
**Floor 2, Sotiri Tofini 4, Agios Atanasios**  
**4102 Limassol, CY**

72 Inventor/es:

**CARMONA OROZCO, MARIA DEL CARMEN;**  
**MONTEFELTRO, ANDRÉS PABLO;**  
**ALVARADO, GABRIEL G.;**  
**VILA BOVER, MIQUEL;**  
**BORTOLOZZI, ANALIA y**  
**ARTIGAS PÉREZ, FRANCESC**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

### Observaciones:

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

ES 2 967 530 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

Composiciones y métodos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson mediante la administración selectiva de moléculas de oligonucleótidos a tipos específicos de neuronas

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a conjugados que comprenden un ácido nucleico específico para una diana de interés y un grupo que permite la administración de los ácidos nucleicos a células específicas en el sistema nervioso central por medio de su afinidad hacia moléculas transportadoras de neurotransmisores en la superficie de dichas células.

### Antecedentes técnicos

El uso de ácidos nucleicos se ha demostrado eficaz para cambiar el estado de una célula. La introducción de ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN) en una célula se puede usar para aumentar o disminuir la expresión de genes particulares en la célula, afectando de esta manera una o más rutas bioquímicas. De las tecnologías basadas en ácido nucleico usadas para cambiar la fisiología celular, interferencia de ARN (ARNi) es el término general dado para regular la expresión de genes a nivel postranscripcional en organismos diversificados. El silenciamiento génico por ARNi se puede lograr usando fragmentos homólogos de ARNbc cortos (21-23 pb) conocidos como interferentes pequeños o "ARNip". Cuando se introduce un ARNbc largo en una línea celular, la enzima celular Dicer lo cortará en moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip). Esta molécula de ARN interferente pequeño se llama ahora ARN guiado. El ARN guiado guiará el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) al ARNm diana homólogo. Una vez que forma una estructura híbrida con la secuencia de ARNm homóloga, el RISC cortará el ARNm. Como resultado, la proteína codificada por el ARNm no se producirá más, produciendo así el silenciamiento del gen. La interferencia de ARN se refiere al proceso de silenciamiento génico postranscripcional específico de secuencia en animales mediado por ARN interferentes pequeños (ARNip).

Sin embargo, un obstáculo principal para el desarrollo de enfoques terapéuticos basados en ARNi para patologías cerebrales es la barrera hematoencefálica (BHE). El cerebro está protegido contra sustancias potencialmente tóxicas por la presencia de dos sistemas barrera: la barrera hematoencefálica (BHE) y la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo (BSLCE). Se considera que la BHE es la vía principal de captación de ligandos del suero ya que su área de superficie es aproximadamente 5000 veces mayor que la de la BSLCE. El endotelio cerebral, que constituye la BHE, representa el principal obstáculo para el uso de potenciales fármacos contra muchos trastornos del SNC. Como regla general, sólo las moléculas lipofílicas pequeñas pueden pasar a través de la BHE, es decir, de la sangre sistémica circulante al cerebro. Muchos fármacos que tienen un tamaño mayor o mayor hidrofobicidad muestran resultados prometedores en estudios animales para tratar trastornos del SNC.

Además de la administración intracerebral directa, se han descrito diferentes estrategias para alcanzar el silenciamiento génico en el SNC por medio de moléculas interferentes de ARN administradas de forma sistémica. Por ejemplo, Kumar et al. (Nature, 2007, 448:39-44) han descrito conjugados de ARNip y un péptido derivado de la glucoproteína del virus de la rabia que comprende una arginina nonamérica y su capacidad para silenciar la expresión génica en el cerebro después de inyección intravenosa. Xia et al. (Pharmaceutical Research, 2007, 24:2309-2316) han descrito conjugados que comprenden un ARNip biotinilado y un conjugado que comprende un anticuerpo anti-receptor de transferrina-avidina que son capaces de silenciar la expresión génica en el sistema nervioso central después de la administración sistémica. El documento WO200979790 describe conjugados que comprenden un ARNip y una serie de péptidos conocidos colectivamente como Angiopeps que son capaces de cruzar la barrera hematoencefálica mediante transcitosis mediada por receptor usando la proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LPR-1) y que permite la administración al SNC de conjugados administrados de forma sistémica que comprenden dichos péptidos. El documento WO2007107789 describe el uso de compuestos capaces de producir interferencia de ARN y que son específicos para dianas presentes en el SNC y la distribución al SNC mediante el uso de administración intranasal.

Varios artículos han sugerido conjugados a agentes de silenciamiento específicos de sinucleína y diferentes moléculas que ayudan la translocación del conjugado a través de las membranas celulares o a través de la barrera hematoencefálica. Por ejemplo, el documento WO2011087804 describe conjugados que comprenden un ARNip específico de alfa-sinucleína y un péptido derivado de la glucoproteína G del virus de la rabia, que permite que el conjugado cruce la barrera hematoencefálica. El documento WO2012027713 describe conjugados de ARNbc específicos de alfa-sinucleína y diferentes fracciones que aumentan la actividad, distribución o captación celular del ARNbc tales como fracciones lipídicas (colesterol), ácido cólico, un tioéter, un tiocolesterol, una cadena alifática (por ejemplo, residuos de dodecandiol o undecilo), un fosfolípido, una poliamina o una cadena de polietilenglicol, ácido adamantano acético, una fracción palmitilo o una fracción octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolessterol. Sin embargo, todos estos conjugados se pretenden para la administración no específica a través de membranas biológicas o barreras biológicas, pero no confieren especificidad hacia las células en donde se expresa sinucleína.

Sin embargo, mientras que todos estos sistemas permiten la administración de ARNip administrados de forma sistémica al SNC, no permiten la administración a tipos celulares específicos dentro del cerebro. El documento WO2011131693 divulga conjugados que comprenden un ácido nucleico que es complementario a una secuencia de ácido nucleico diana y cuya expresión previene o reduce la expresión del ácido nucleico diana y un agente de selectividad que es capaz de unirse con alta afinidad a un transportador de neurotransmisor. Estos conjugados son útiles para la administración de un ácido nucleico particular a una célula de interés.

La posibilidad de administrar ARNip de especificidades conocidas al sistema nervioso central será útil para el tratamiento de enfermedades producidas por una actividad/expresión indeseada de un gen determinado, incluyendo depresión, trastornos cognitivos, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, etc.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que con frecuencia disminuye las capacidades motoras del paciente, el habla y otras funciones. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson provienen de la actividad muy reducida de células dopaminérgicas en la región pars compacta de la sustancia negra (SNpc). Estas neuronas se proyectan al cuerpo estriado y su pérdida produce alteraciones en la actividad de los circuitos neurales en los ganglios basales que regulan el movimiento, en esencia una inhibición de la vía directa y excitación de la vía indirecta. La vía directa facilita el movimiento y la vía indirecta inhibe el movimiento, así la pérdida de estas células produce un trastorno de movimiento hipocinético. La falta de dopamina produce una inhibición aumentada del núcleo ventral anterior del tálamo, que envía proyecciones excitadoras a la corteza motora, produciendo así hipocinesia.

La EP se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y la presencia de inclusiones intracelulares designadas cuerpos de Lewy (CL). Neuroquímicamente, la EP está marcada por la disfunción del complejo mitocondrial I e índices aumentados de estrés oxidativo. Se han propuesto varios mecanismos patogénicos para la EP incluyendo estrés oxidativo y nitrosativo, disfunción mitocondrial, mal plegamiento y agregación de proteínas y apoptosis. La EP es fundamentalmente esporádica, pero se ha mostrado que algunos casos de EP son familiares. El primer gen de EP familiar identificado fue la  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) que de hecho es el componente principal de los CL en todos los pacientes de EP. La función normal de la  $\alpha$ -sinucleína se entiende poco. La  $\alpha$ -sinucleína se puede unir a lípidos y, en neuronas, se asocia con vesículas presinápticas y la membrana plasmática, posiblemente a través de balsas lipídicas. Las formas patológicas depositadas de  $\alpha$ -sinucleína están agregadas y muestran menor solubilidad que la proteína normal. Se han descrito tres mutaciones puntuales que causan EP familiar, pero también se ha descrito que duplicaciones y triplicaciones del gen *SNCA* son responsables de la EP y la enfermedad de los cuerpos de Lewy. Por lo tanto, incluso sin variantes de secuencia, la dosis de  $\alpha$ -sinucleína puede ser causante de la enfermedad de los cuerpos de Lewy.

La  $\alpha$ -sinucleína afecta a la mitocondria y probablemente induce apoptosis. De hecho, hay evidencias en acumulación de una relación próxima entre  $\alpha$ -sinucleína y daño oxidativo: la sobreexpresión de una  $\alpha$ -sinucleína mutante sensibiliza las neuronas al estrés oxidativo y daño por dopamina e inhibidores del complejo I, produciendo carbonilación de proteínas aumentada y peroxidación lipídica *in vitro* e *in vivo*. Por el contrario, la disfunción del complejo mitocondrial I se ha asociado a formas esporádicas de la EP. El daño oxidativo dependiente del complejo I y la función mitocondrial defectuosa es una causa principal de la degeneración neuronal y muerte celular en la EP. Por tanto, la función mitocondrial defectuosa y la producción de ROS aumenta el nivel del conjunto de citocromo c en el espacio intermembrana mitocondrial, lo que permite su rápida liberación cuando se activa el agonista de muerte celular Bax.

En suma, el escenario en la EP sería una situación de disfunción mitocondrial neuronal con aumento en la producción de ROS que por una parte aumentaría la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína y por otra activaría la muerte celular mediada por Bax. Además, la acumulación de  $\alpha$ -sinucleína, a su vez, aumentaría la producción celular de ROS y la inducción de degeneración neuronal.

El tratamiento más ampliamente usado para la EP es L-DOPA en varias formas. Sin embargo, solo el 1-5% de la L-DOPA entra en las neuronas dopaminérgicas. La L-DOPA restante con frecuencia se metaboliza a dopamina en otro lugar, produciendo una amplia variedad de efectos secundarios. Los inhibidores de dopa descarboxilasa como carbidopa y benserazida también se usan para el tratamiento de la EP ya que ayudan a prevenir el metabolismo de L-DOPA antes de que alcance las neuronas dopaminérgicas y en general se dan como preparaciones de combinación de carbidopa/levodopa y benserazida/levodopa. Además, los agonistas de dopamina son moderadamente eficaces y actúan estimulando algunos receptores de dopamina. Sin embargo, producen que los receptores de dopamina se vuelvan progresivamente menos sensibles, aumentando por último los síntomas.

Los enfoques antisentido también podrían ser útiles, y se ha descrito que funcionan en cerebro de rata y ratón. Este planteamiento se basa en la idea de que la  $\alpha$ -sinucleína realmente es dispensable para la función del SNC en seres humanos, como parece ser en ratón, pero tal vez incluso una disminución moderada en los niveles de proteína sería suficiente para disminuir la evolución de la EP.

Lapa et al. (Pharmaceutical Chemistry Journal, 2011, 45:323-328) divulga indatralina como inhibidor de recaptación triple (serotonina-norepinefrina-dopamina).

5 El documento WO2012027713 es la publicación de una publicación de patente internacional que divulga ARNbc que se dirige a alfa-sinucleína.

El documento US2012129912 es la publicación de una solicitud de patente en EE UU que divulga ácidos nucleicos que se dirigen a alfa-sinucleína.

10 Sin embargo, a pesar de los avances hechos en el desarrollo de agentes terapéuticos para EP, todavía hay la necesidad de compuestos alternativos que sean específicamente capaces de prevenir la actividad reducida de células dopaminérgicas en la región pars compacta de la sustancia negra.

### Compendio de la invención

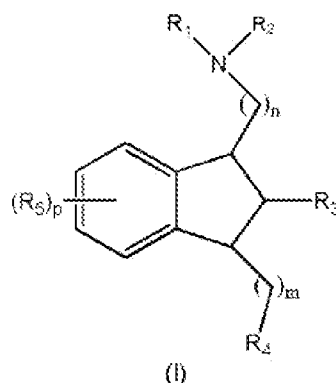
15 Los inventores de la presente invención han identificado diferentes regiones particulares en la secuencia de ARNm de alfa-sinucleína humana que, cuando son dianas usando moléculas silenciadoras, producen el corte del ARNm de alfa-sinucleína. Esto se ha mostrado probando oligonucleótidos antisentido en un ensayo mediado por RNasa H y probando la disminución del ARNm de alfa-sinucleína. Además, la versión gapmera del ácido nucleico de  
20 silenciamiento preferido (cuccCTCCACTGTCuucu, SEQ ID NO: 2) se ha acoplado al triple bloqueante indatralina. Los inventores han mostrado que la indatralina es capaz de dirigir un oligonucleótido antisentido a células que expresan el receptor de serotonina 5-HT<sub>1A</sub> cuando se administra por vía intranasal, y que la indatralina es capaz de dirigir un fluoróforo a áreas del cerebro que contienen células que expresan un transportador de dopamina (DAT) (por ejemplo, la sustancia negra), a áreas del cerebro que contienen células que expresan un transportador de norepinefrina NET (por ejemplo, locus cerúleo) y a áreas del cerebro que contienen células que expresan un  
25 transportador de serotonina SERT (por ejemplo, núcleos del rafe y rafe dorsal). Además, los inventores también han mostrado que la administración intranasal del conjugado que comprende indatralina y el gapmero candidato preferido produce un descenso en los niveles de ARNm de sinucleína determinado mediante hibridación *in situ*.

30 La molécula de silenciamiento según la invención tiene algunas ventajas. En primer lugar, está dirigida específicamente a células en donde la proteína que se va a silenciar se expresa, evitando los efectos secundarios debidos al silenciamiento de la proteína en localizaciones indeseadas. En segundo lugar, la molécula silenciadora según la invención se transloca a través de la membrana celular usando un transportador de neurotransmisor.

35 De esta manera, en un primer aspecto, la invención se refiere a un conjugado que comprende:

- i) al menos un agente de selectividad que es un inhibidor de recaptación triple (IRSND) y
- ii) al menos un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la  
40 misma célula que el transportador del neurotransmisor en donde dicha molécula diana es  $\alpha$ -sinucleína o el ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína,

en donde el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm de alfa-sinucleína se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las  
45 posiciones 499-516 (SEQ ID NO: 5), 448-465 (SEQ ID NO: 4) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína definida en el número de acceso del NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7) y en donde el inhibidor de recaptación triple tiene la siguiente estructura (I)



en donde

n o m son números enteros que tiene cada uno un valor entre 0 y 6, inclusive;

p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;

R<sub>1</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -C(=O)R<sub>A</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>; -C(=O)N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>A</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

R<sub>2</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -C(=O)R<sub>B</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>; -C(=O)N(R<sub>B</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>B</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>B</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

R<sub>3</sub> es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -OR<sub>C</sub>; -C(=O)R<sub>C</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>C</sub>; -SOR<sub>C</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>C</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>C</sub>; -OC(=O)R<sub>C</sub>; -OC(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)OR<sub>C</sub>; o -C(R<sub>C</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>C</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

R<sub>4</sub> es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;

R<sub>5</sub> es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -OR<sub>E</sub>; -C(=O)R<sub>E</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>E</sub>; -SOR<sub>E</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>E</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>E</sub>; -OC(=O)R<sub>E</sub>; -OC(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)OR<sub>E</sub>; o -C(R<sub>E</sub>)<sub>3</sub> en donde cada aparición de R<sub>E</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un conjugado según la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy.

Estos y otros objetos de la presente invención se describirán adicionalmente en la sección de descripción detallada que sigue, y no se pretende que sean limitantes de la presente invención. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende normalmente el experto en la materia a la que pertenece la invención. Se pueden usar métodos y materiales equivalentes a los descritos aquí en la práctica de la presente invención. A lo largo de toda la descripción y reivindicaciones no se pretende que la palabra "comprende" y sus variaciones excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas.

#### Breve descripción de las figuras

La **figura 1** muestra la ausencia de respuesta de hipotermia inducida por bromhidrato de (R)-(+)-8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT, agonista selectivo de 5-HT<sub>1A</sub>R) en ratones que recibieron por vía intranasal un oligo anti-5HT<sub>1A</sub> con indatralina. Los ratones recibieron: i) vehículo (PBS); ii) indatralina ARNip sin sentido (IND-ARNip ss); iii) 30 µg de indatralina-ARNip 1A77 (IND-ARNip 1A77), iv) 30 µg de sertralina-ARNip 1a77 (SERT-ARNip 1A77) o v) 100 de indatralina-ARNip 1A77 (IND-ARNip 1A77). Se evaluó la temperatura corporal 5 minutos antes y 15, 30, 60 y 120 minutos después de la administración de 8-OH-DPAT (1 mg/kg i.p.). Los valores se muestran como media de cambios en la temperatura corporal ± EEM de 5 ratones por grupo.

La **figura 2** muestra un ensayo de RNasa H realizado para moléculas de selección candidatas. Después de la transcripción in vitro del ARNm de alfa-sinucleína humana, este ARNm se purificó y sometió a un ensayo de RNasa H para medir la actividad de secuencias individuales como potenciales inductores de la enzima. Brevemente, se incubó el ARNm (100 nM) en tampón con un exceso de 5 veces de diferentes moléculas (500 nM) a 37°C durante 7,5 minutos. Después de eso, la reacción se paró, las muestras se corrieron en un gel de agarosa y se visualizaron con UV. Las secuencias eran específicas para seres humanos, ratón o ambos. Las secuencias seleccionadas (candidatos) se eligieron respecto a su capacidad de inducir actividad RNasa H, su homología interespecie y la falta de homología con las sinucleínas beta y gamma.

La **figura 3** muestra un esquema del conjugado según la invención. Comprende indatralina como agente de selectividad y un gapmero de 18 bases, unidos por un enlazador de C10.

5 La **figura 4** muestra la inhibición de la expresión del ARNm de alfa-sinucleína por las moléculas candidatas 1232, 1233 y 1234 según la invención en bulbos olfativos (BO), sustancia negra (SNc/VTa), rafe dorsal (DR) y rafe medial (MnR).

10 La **figura 5** muestra un análisis de las sustancias negra medial y lateral (SNs) de muestras de cerebro post mortem obtenidas de individuos con enfermedad de Parkinson (EP) esporádica. La SN muestra daño tisular extenso en la EP. Los resultados proporcionan entendimiento sobre la patogénesis de la EP.

15 La **figura 6** muestra un alineamiento del ARNm de sintafilina humana. Se alinearon los ARNm de sintafilina humana, de macaca mulata y ratón con el software de visionado de secuencias CLC y se analizaron para encontrar las putativas homologías entre ellos y el candidato 1234 (los 15 nt del candidato 1234 comunes al ARNm de  $\alpha$ -sinucleína en seres humanos se muestra en una caja).

La **figura 7** muestra un esquema de la molécula conjugada preferida según la invención, 1233 (NLF-PD1233).

20 La **figura 8** muestra los niveles de proteína alfa-sinucleína en la pars compacta de la sustancia negra (SNc) por inmunotransferencia (A). Niveles en SNc/VTa de alfa-sinucleína normalizados frente a beta-actina (B) y tirosina hidroxilasa (TH) (C), y niveles de TH normalizados frente a beta-actina (D). N=8-10. Significancia: prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (\*p<0,05 frente a PBS). Como control para la extracción del área, los animales donde los niveles de TH frente a beta-actina eran 2 veces menores que la media no se incluyeron en el análisis.

30 La **figura 9** muestra los niveles de proteína alfa-sinucleína en el cuerpo estriado por inmunotransferencia (A). Se muestran los niveles en el cuerpo estriado de alfa-sinucleína normalizados frente a beta-actina (B) y tirosina hidroxilasa (TH) (C), así como niveles de TH normalizada frente a beta-actina (D). N=8-10. Significancia: prueba de comparaciones múltiples de Newman-Keuls (\*p<0,05 frente a PBS). Como control para la extracción del área, los animales donde los niveles de TH frente a beta-actina eran 2 veces menores que la media no se incluyeron en el análisis.

35 La **figura 10** muestra las concentraciones en plasma en ratones de 1233 (NLF-PD-1233) sin modificar frente al derivado 3' protegido del mismo.

La **figura 11** muestra concentraciones en sangre de 1233 (NLF-PD-1233) en monos después de la administración intravenosa (IV). Los datos se expresan como valores medios.

40 La **figura 12** muestra las concentraciones en LCR (líquido cefalorraquídeo) y sangre de 1233 (NLF-PD-1233) en monos después de la administración intranasal (IN). Los datos se expresan como valores medios.

45 La **figura 13** muestra las concentraciones en tejidos de 1233 (NLF-PD-1233) sin modificar en ratones después de la dosificación intravenosa.

La **figura 14** muestra las concentraciones en tejidos de 1233 (NLF-PD-1233) sin modificar más metabolitos en ratones después de la dosificación intravenosa.

50 La **figura 15** muestra las concentraciones en tejidos del derivado 3' protegido de 1233 (NLF-PD-1233) en ratones después de la dosificación intravenosa.

La **figura 16** muestra las concentraciones en tejidos del derivado 3' protegido de 1233 (NLF-PD-1233) más metabolitos en ratones después de la dosificación intravenosa.

55 La **figura 17** muestra un ensayo *in vivo* de microdialísis de la liberación de dopamina inducida por veratridina medida por HPLC en animales tratados con vehículo (PBS) o 1233 (NLF-PD-1233, 4 días consecutivos, 1 mg/kg/día).

60 La **figura 18** muestra un ensayo *in vivo* de microdialísis de dopamina extracelular medida por HPLC en animales tratados con vehículo (PBS) o 1233 (NLF-PD-1233, 4 días consecutivos, 1 mg/kg/día).

#### Descripción detallada de la invención

65 Los autores de la presente invención han observado que es posible dirigir específicamente un ácido nucleico a una célula de interés que expresa un transportador de neurotransmisor acoplado covalentemente dicho ácido nucleico a una molécula que es capaz de unirse específicamente a dicho transportador del neurotransmisor y, más en

particular, a un inhibidor de dicho transportador. En particular, los autores han mostrado que un ácido nucleico que se dirige a regiones particulares de ARNm de alfa-sinucleína acoplado a un IRSND es capaz de disminuir los niveles de expresión del ARNm de alfa-sinucleína.

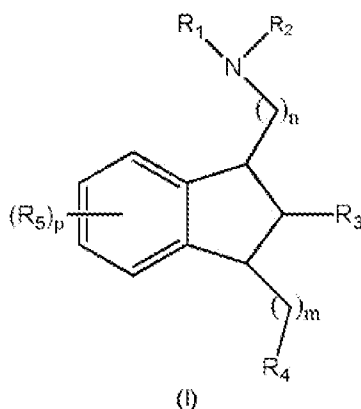
#### 5 A. Conjugados de la invención

En un primer aspecto la invención se refiere a un conjugado que comprende

- 10 i) al menos un agente de selectividad que es un inhibidor de recaptación triple (IRSND) y  
 ii) al menos un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor en donde dicha molécula diana es  $\alpha$ -sinucleína o el ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína,

15 en donde el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm de alfa-sinucleína se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las posiciones 499-516 (SEQ ID NO: 5), 448-465 (SEQ ID NO: 4) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína definida en el número de acceso del NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7) y en donde el inhibidor de recaptación triple tiene la siguiente estructura (I)

20



en donde

25

n o m son números enteros que tiene cada uno un valor entre 0 y 6, inclusive;

p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;

30 R<sub>1</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -C(=O)R<sub>A</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>; -C(=O)N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>A</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

35 R<sub>2</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -C(=O)R<sub>B</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>; -C(=O)N(R<sub>B</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>B</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>B</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

40 R<sub>3</sub> es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -OR<sub>C</sub>; -C(=O)R<sub>C</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>C</sub>; -SOR<sub>C</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>C</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>C</sub>; -OC(=O)R<sub>C</sub>; -OC(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)OR<sub>C</sub>; o -C(R<sub>C</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>C</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

50 R<sub>4</sub> es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;

$R_E$  es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-OR_E$ ;  $-C(=O)R_E$ ;  $-CO_2R_E$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_E$ ;  $-SOR_E$ ;  $SO_2R_E$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_E)_2$ ;  $-NHC(=O)R_E$ ;  $-NR_EC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-OC(=O)OR_E$ ;  $-OC(=O)R_E$ ;  $-OC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-NR_EC(=O)OR_E$ ; o  $-C(R_E)_3$  en donde cada aparición de  $R_E$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxi; o fracción heteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo.

El término "conjugado", como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto resultante de la unión covalente de dos o más compuestos individuales. En la presente invención, conjugado se refiere a una molécula que comprende un agente de selectividad y un ácido nucleico que están covalentemente acoplados, siendo dicho acoplamiento directo o a través de un compuesto enlazador.

Los términos "acoplamiento covalente" o "unión covalente" significan que el ácido nucleico y el agente de selectividad están unidos covalentemente entre sí de forma directa, o están unidos covalentemente entre sí de forma indirecta a través de un grupo o grupos intermedios, tales como un enlazador, o un puente o un espaciador, fracción o fracciones.

#### A.1. El agente de selectividad de los conjugados de la invención

La expresión "agente de selectividad que se une específicamente a uno o más de un transportador de neurotransmisor", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier sustancia que se une a un transportador de neurotransmisor. Esta especificidad de unión permite la administración de una molécula que esté unida a dicho agente de selectividad a la célula, tejido u órgano que contiene dicho transportador de neurotransmisor. De esta manera, un conjugado que tenga dicho agente de selectividad se dirigirá específicamente a dichas células cuando se administra a un animal o se pone en contacto in vitro con una población de células de diferentes tipos.

Como se usa en el presente documento, la unión específica de una primera molécula a una segunda molécula se refiere a la capacidad de la primera molécula de unirse a dicha segunda molécula de una manera que es perceptiblemente diferente de una interacción no específica. Un agente de selectividad según la presente invención puede mostrar una  $K_d$  para la diana (el transportador del neurotransmisor) de al menos aproximadamente  $10^{-4}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-5}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-6}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-7}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-8}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-10}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-11}$  M, alternativamente al menos aproximadamente  $10^{-12}$  M o mayor.

El término "transportador de neurotransmisor", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que pertenece a una clase de proteínas transportadoras de membrana que atraviesa las membranas celulares de neuronas y cuya función primaria es llevar neurotransmisores a través de estas membranas y dirigir su transporte adicional a localizaciones intracelulares específicas. Los transportadores de neurotransmisores que pueden ser diana de los agentes de selectividad de la invención incluyen, sin limitación, transportadores de captación presentes en la membrana plasmática de neuronas y células de glía, que bombean neurotransmisores desde el espacio extracelular a la célula. Este proceso se basa en el gradiente de  $Na^+$  a través de la membrana plasmática, particularmente el cotransporte de  $Na^+$ . Se han identificado dos familias de proteínas. Una familia incluye los transportadores de GABA, monoaminas tales como noradrenalina, dopamina, serotonina y aminoácidos tales como glicina y prolina. Los componentes estructurales comunes incluyen doce putativos dominios transmembrana de  $\alpha$ -hélice, extremos N y C citoplásmicos y un gran bucle extracelular glucosilado que separa los dominios transmembrana tres y cuatro. Esta familia de proteínas homólogas deriva su energía del cotransporte de iones  $Na^+$  y  $Cl^-$  con el neurotransmisor en la célula (transportadores de neurotransmisores  $Na^+/Cl^-$ ). La segunda familia incluye transportadores para aminoácidos excitadores como glutamato. Los componentes estructurales comunes incluyen 6-10 putativos dominios transmembrana, extremos N y C citoplásmicos y glucosilaciones en los bucles extracelulares. Los transportadores de aminoácidos excitadores no dependen de  $Cl^-$  y pueden requerir iones intracelulares de  $K^+$  (transportadores de neurotransmisores  $Na^+/K^+$ ) (Liu, Y. et al. (1999) Trends Cell Biol. 9: 356-363).

Los transportadores de neurotransmisores que pueden ser dianas de los agentes de selectividad de la invención también incluyen transportadores de neurotransmisores presentes en membranas de vesículas intracelulares, típicamente vesículas sinápticas, cuya función primaria es concentrar neurotransmisores del citoplasma en la vesícula, antes de la exocitosis del contenido vesicular durante la transmisión sináptica. El transporte vesicular usa el gradiente electroquímico a través de la membrana vesicular generado por una  $H^+$ -ATPasa. Dos familias de proteínas están implicadas en el transporte de neurotransmisores a vesículas. Una familia usa principalmente el intercambio de protones para dirigir el transporte en las vesículas secretoras e incluye los transportadores para monoaminas y acetilcolina. Por ejemplo, los transportadores de monoaminas intercambian dos protones lumenales por cada molécula transmisor citoplásmico. La segunda familia incluye los transportadores de GABA, que se basan



en la carga positiva en el interior de la vesícula sináptica. Las dos clases de transportadores vesiculares no muestran similitud de secuencia entre sí y tienen estructuras diferentes de las de transportadores de la membrana plasmática (Schloss, P. et al. (1994) *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 595-599; Liu, Y. et al. (1999) *Trends Cell Biol.* 9: 356-363).

El agente de selectividad no es un péptido.

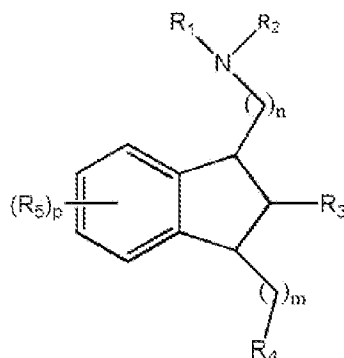
Los tipos específicos de transportadores de neurotransmisores que pueden ser diana de los agentes de selectividad incluyen transportadores de dopamina (DAT), transportadores de serotonina (SERT) y transportadores de norepinefrina (NET).

El término "transportador de dopamina" o "DAT" o "SLC6A3" se refiere a una molécula que es una proteína integral de membrana que transporta el neurotransmisor dopamina desde el espacio sináptico y lo deposita en las células circundantes, terminando así la señal del neurotransmisor. El gen del SLC6A3 humano (familia de transportador de soluto 6, transportador de neurotransmisor, dopamina, miembro 3) está depositado en NCBI GenBank (versión fechada el 7 de octubre, 2012) con el número de acceso NG\_015885.1, y el ARNm de SLC6A3 humano está depositado con el número de acceso NM\_001044.4. La proteína del transportador de dopamina humano está depositada en GenBank con el número de acceso NP\_001035.1.

El término "transportador de serotonina" o "SERT" o "SLC6A4", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que es una proteína integral de membrana que transporta el neurotransmisor serotonina del espacio sináptico a las neuronas presinápticas. El gen humano de SLC6A4 (familia de transportador de soluto 4, transportador de neurotransmisor, serotonina, miembro 4) está depositado en NCBI GenBank (versión fechada el 21 de octubre, 2012) con el número de acceso NG\_011747.1 y el ARNm de SLC6A4 humano está depositado en el número de acceso NM\_001045.4. La proteína humana del transportador de serotonina está depositada en GenBank con el número de acceso NP\_001036.1. Las secuencias de SERT humana, de rata, ratón y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P31645, P31652, Q60857 y Q9XT49 respectivamente. De forma similar a los ácidos nucleicos que se dirigen al ADNc de 5-HT<sub>1A</sub>R, cualquier región del ADNc de SERT puede ser diana siempre que produzca una inhibición sustancial de los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, se pueden identificar los ácidos nucleicos específicos de SERT adecuados como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm de SERT o la proteína SERT en células que expresan SERT después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico a probar.

El término "transportador de norepinefrina" o "NET" o "SLC6A2" se refiere a una molécula que es una proteína transmembrana que transporta norepinefrina sinápticamente liberada de vuelta a la neurona presináptica. El gen humano de SLC6A2 (familia de transportador de soluto 6, transportador de neurotransmisor, noradrenalina, miembro 2) está depositado en NCBI GenBank (versión fechada el 21 de octubre, 2012) con el número de acceso NG\_016969.1. Cuatro transcritos están depositados en GenBank para el transportador humano de norepinefrina. La variante 1 del transcrito de ARNm (ARNm1) es la variante de transcrito del transportador de norepinefrina humano que codifica la isoforma más larga o isoforma 1. Este ARNm1 está depositado en GenBank con el número de acceso NM\_001172504.1. La variante 2 del transcrito de ARNm (ARNm2) es la variante de transcrito que tiene un exón 3' alternativo que incluye la región codificante en comparación con la variante 1. Este ARNm2 está depositado en GenBank con el número de acceso NM\_001172501.1. La variante 3 del transcrito de ARNm (ARNm3) es la variante de transcrito que tiene un exón 3' alternativo que incluye la región codificante en comparación con la variante 1. Este ARNm3 está depositado en GenBank con el número de acceso NM\_001043.3. La variante 4 del transcrito de ARNm (ARNm4) es una variante de transcrito que tiene secuencias 5' y 3' alternativas que incluyen las regiones codificantes 5' y 3' en comparación con la variante 1. Este ARNm4 está depositado en GenBank con el número de acceso NM\_001172502.1. Cuatro isoformas de proteína humana están depositadas en GenBank, con los números de acceso, NP\_001165975.1, NP\_001165972.1, NP\_001034.1 y NP\_001165973.1.

El agente de selectividad es un inhibidor de recaptación triple tiene la siguiente estructura (I):



(I)

en donde

- 5 n o m son números enteros que tiene cada uno un valor entre 0 y 6, inclusive;  
 p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;  
 R<sub>1</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o  
 acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  
 10 arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin  
 ramificar; -C(=O)R<sub>A</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>; -C(=O)N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>A</sub> es independientemente un  
 hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción  
 arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o  
 fracción heteroariltio;  
 15 R<sub>2</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o  
 acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  
 arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin  
 ramificar; -C(=O)R<sub>B</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>B</sub>; -C(=O)N(R<sub>B</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>B</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>B</sub> es independientemente un  
 hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción  
 20 arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o  
 fracción heteroariltio;  
 R<sub>3</sub> es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  
 heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir,  
 ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin  
 sustituir, ramificado o sin ramificar; -OR<sub>C</sub>; -C(=O)R<sub>C</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>C</sub>; -SOR<sub>C</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>;  
 25 -NHC(=O)R<sub>C</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>C</sub>; -OC(=O)R<sub>C</sub>; -OC(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)OR<sub>C</sub>; o -C(R<sub>C</sub>)<sub>3</sub>; en donde  
 cada aparición de R<sub>C</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción  
 heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino,  
 alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;  
 30 R<sub>4</sub> es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin  
 ramificar;  
 R<sub>5</sub> es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  
 heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir,  
 ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin  
 sustituir, ramificado o sin ramificar; -OR<sub>E</sub>; -C(=O)R<sub>E</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>E</sub>; -SOR<sub>E</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>;  
 35 -NHC(=O)R<sub>E</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>E</sub>; -OC(=O)R<sub>E</sub>; -OC(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)OR<sub>E</sub>; o -C(R<sub>E</sub>)<sub>3</sub>; en donde  
 cada aparición de R<sub>E</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción  
 heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino,  
 alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo.
- 40 El término "triple inhibidor de recaptación" o "TRI", también conocido como inhibidor de la recaptación de serotonina,  
 norepinefrina y dopamina (IRSND), se refiere a una molécula que simultáneamente actúa como inhibidor de la  
 recaptación para los neurotransmisores monoamina, serotonina (5-HT), norepinefrina (noradrenalina, NA) y  
 45 dopamina (DA), bloqueando la acción del transportador de serotonina (SERT), el transportador de norepinefrina  
 (NET) y el transportador de dopamina (DAT), respectivamente. Esto a su vez, produce concentraciones  
 intracelulares aumentadas de estos neurotransmisores y, por tanto, un aumento en la neurotransmisión  
 serotoninérgica, noradrenérgica o adrenérgica y dopaminérgica. En una forma de realización particular, el triple  
 inhibidor de recaptación de la invención, es un triple inhibidor de la recaptación de dopamina, serotonina y  
 norepinefrina.
- 50 El término "doble inhibidor de recaptación" se refiere a una molécula capaz de inhibir la recaptación para dos  
 transportadores de neurotransmisores simultáneamente. En una forma de realización particular, el inhibidor doble de  
 recaptación de la invención es un doble inhibidor de recaptación de norepinefrina y dopamina.
- 55 El término "inhibidor único de recaptación" se refiere a una molécula capaz de inhibir la recaptación de un  
 transportador de neurotransmisor particular. En una forma de realización particular de la invención, El inhibidor único  
 de recaptación es un inhibidor único de recaptación de dopamina.
- 60 El término "inhibidor de la recaptación de dopamina" o "IRD" actúa como un inhibidor de recaptación para el  
 neurotransmisor dopamina bloqueando la acción del transportador de dopamina (DAT). Esto a su vez produce  
 concentraciones extracelulares aumentadas de dopamina y por lo tanto un aumento en la neurotransmisión  
 dopaminérgica. Los IRD adecuados incluyen, sin limitación, fármacos tales como amineptina,  
 Benzatropina/Benzotropina, Bupropion, dexmetilfenidato, Esketamina, Etibenzatropina/Ethybe, Ponalida,  
 Fencamfamina, Fencamina, Ketamina, Lefetamina, Medifoxamina, Mesocarb, Metilfenidato, Nefopam, Nomifensina,  
 Pipradrol, Prolintano, Pirovalerona, Tiletamina y Triptelenamina; productos químicos de investigación tales como  
 65 altropano, ácido amfonélico, benociclidina, brasofensina, bromantano, DBL-583, dicloropano, diclofensina,

Dieticlidina, difluoropina, gaciclidina, GBR-12.935, indatralina, yoflupano, yometopano, manifaxina, radafaxina, tametralina, tesofensina troparil y vanoxerina. Los IRD adecuados se pueden identificar usando ensayos que conoce el experto en la materia tales como la determinación de la capacidad del putativo IRD de inhibir la captación de alta afinidad de la dopamina por preparaciones sinápticas preparadas de cuerpo estriado de rata llevados a cabo como se describe usando métodos publicados por Kula et al., (Life Sciences 34: 2567-2575, 1984).

El término "inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina" o "IRND", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que actúa como un inhibidor de recaptación para los neurotransmisores norepinefrina y dopamina bloqueando la acción del transportador de norepinefrina (NET) y el transportador de dopamina (DAT), respectivamente. Esto a su vez produce concentraciones extracelulares aumentadas tanto de norepinefrina como de dopamina y por lo tanto un aumento en las neurotransmisiones adrenérgica y dopaminérgica. Los IRND adecuados para su uso en los conjugados de la presente invención incluyen, sin limitación, Amineptina (Survector, Maneon, Directin), Bupropion (Wellbutrin, Zyban), Dexametilfenidato (Focalin), Fencamfamina (Glucocnergan, Reactivan), Fencamina (Altimina, Siccior), Lefetamina (Santenol), Metilfenidato (Ritalin, Concerta), Nomifensina (Merital), Pipradrol (Meretran), Prolintano (Promotil, Katovit), Pirovalerona (Centroton, Thymergix), Nefopam (Acupan), adhiperforina (encontrada en *Hypericum perforatum* (hierba de san Juan)), hiperforina (encontrada en *Hypericum perforatum* (hierba de San Juan)), Cocaína, Desoxipipradrol (2-DPMP), Difenilprolinol (D2PM), Metilenedioxipirovalerona (MDPV), Cilobamina, Manifaxina (GW-320.659), Radafaxina (GW-353.162), Tametralina (CP-24.441).

El término "inhibidor de la recaptación de serotonina" o "IRS" se refiere a una molécula que es capaz de bloquear la captación de serotonina e incluye tanto inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) (que bloquean específicamente la captación de serotonina sin afectar sustancialmente a otros neurotransmisores) así como inhibidores no selectivos de la recaptación de serotonina tal como el inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina (IRSN) o el inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina-dopamina (IRSND).

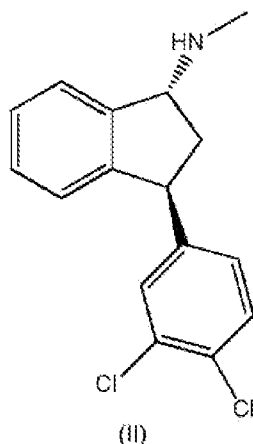
El término "inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina" o "ISRS" se refiere a inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina sin afectar sustancialmente la recaptación de otros neurotransmisores o sistemas transportadores. Estos compuestos actúan principalmente en la célula serotoninérgica presináptica produciendo un aumento en el nivel extracelular del neurotransmisor serotonina, aumentado por ello el nivel de serotonina disponible para unirse al receptor postsináptico e invirtiendo el efecto de la deficiencia de la actividad de este sistema de neurotransmisor monoaminérgico en el cerebro. Ejemplos ilustrativos no limitantes de ISRS incluyen sertralina (CAS 79617-96-2), un análogo estructural de la sertralina, fluoxetina (CAS 54910-89-3), fluvoxamina (CAS 54739-18-3), paroxetina (CAS 61869-08-7), indaplina (CAS 63758-79-2), zimeldina (CAS 56775-88-3), citalopram (CAS 59729-33-8) y escitalopram (CAS 219861-08-2). Los ensayos para determinar si un compuesto determinado actúa como un ISRS son, por ejemplo, la capacidad de reducir la captación ex vivo de serotonina y de antagonizar el efecto de reducir la serotonina de p-cloroanfetamina sin afectar a la captación en corazón de rata de [<sup>3</sup>H]norepinefrina como se describe esencialmente en Koe et al. (J. Pharmacol. Exp. Ther., 1983, 226:686-700).

El término "inhibidor de la recaptación de serotonina-norepinefrina" o "IRSN" se refiere a una familia de compuestos que son capaces de inhibir la recaptación de serotonina bloqueando el transportador de serotonina y la recaptación de norepinefrina bloqueando el transportador de norepinefrina. Esta familia incluye compuestos tales como venlafaxina (CAS 93413-69-5), desvenlafaxina (CAS 93413-62-8), duloxetina (CAS 116539-59-4), milnacipran (CAS 92823-85-3), sibutramina (106650-56-0), tramadol (CAS 27203-92-5) y bicipadina (CAS 71195-57-8). Los ensayos para determinar si un compuesto determinado actúa como un IRSN son, por ejemplo, la capacidad de reducir la captación de serotonina y norepinefrina por sinaptosomas de cerebro como se describe esencialmente en Bolden-Watson C, Richelson E. (Life Sci. 1993;52(12):1023-9). Un tipo particular de IRSN son antidepresivos tricíclicos que son IRSN que tienen una estructura molecular general que comprende tres anillos. Entre los antidepresivos tricíclicos son prominentes los tricíclicos lineales, por ejemplo, imipramina, desipramina, amitriptilina, nortriptilina, protriptilina, doxepina, ketipramina, mianserina, dotiepina, amoxapina, dibenzepina, melitraceno, maprotilina, flupentixol, azafeno, tianeptina y compuestos relacionados que muestran una actividad similar. Los tricíclicos angulares incluyen indrillina, clodazona, nomifensina y compuestos relacionados. Se ha mostrado que una variedad de otros antidepresivos estructuralmente diversos, por ejemplo, iprindol, wellbatrina, nialamida, milnaciprano, feneizina y tranilcipromina producen actividades similares. Son funcionalmente equivalentes a los antidepresivos tricíclicos y por lo tanto están incluidos en el ámbito de la invención. De esta manera, el presente inventor pretende que el término antidepresivo tricíclico abarque una clase amplia de antidepresivos descritos anteriormente junto a compuestos relacionados que comparten la propiedad común de que todos poseen actividad antidepresiva y que incluye, sin limitación, compuestos tales como amitriptilina, amitriptilinoxido, carbamazepina, butriptilina, clomipramina, demexiptilina, desipramina, dibenzepina, dimetacrina, dosulepina/dotiepina, Doxepina, Imipramina, Imipraminoxido, Iprindol, Lofepramina, Melitraceno, Metapramina, Nitroxazepina, Nortriptilina, Noxiptilina, pregabalina, Propizepina, Protriptilina, Quinupramina y Trimipramina.

El término "inhibidor de la recaptación de noradrenalina", "IRN", IRNE, "inhibidor de la recaptación adrenérgica" o "IRA" se refiere a una familia de compuestos que son capaces de bloquear la recaptación de noradrenalina y adrenalina bloqueando la acción del transportador de norepinefrina (NET). Esta familia de compuestos incluye los

IRN selectivos que bloquean exclusivamente el NET sin afectar a otros transportadores de monoaminas, así como IRN no selectivos tales como los IRSN, que bloquean el transportador de norepinefrina y el transportador de serotonina (véase anteriormente), los inhibidores de la recaptación de norepinefrina-dopamina (IRND), que bloquean los transportadores de norepinefrina y dopamina (véase posteriormente), antidepresivos tricíclicos (véase anteriormente). Los INR selectivos adecuados para la presente invención incluyen sin limitación, Atomoxetina/Tomoxetina (Strattera o CAS 83015-26-3), Mazindol (Mazanor, Sanorex o CAS 22232-71-9), Reboxetina (Edronax, Vestra o CAS 98819-76-2) y Viloxazina (Vivala o CAS 46817-91-8).

En una forma de realización más preferida de la invención, el agente de selectividad del conjugado de la invención es un inhibidor triple de recaptación que tiene la siguiente estructura (II):



en donde el agente de selectividad que tiene la estructura (II) también se conoce como (1R,3S)-3-(3,4-diclorofenil)-N-metil-2,3-dihidro-1H-inden-1-amina o indatralina.

#### A.2. El ácido nucleico del conjugado de la invención

El segundo componente del conjugado según la presente invención es un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor, en donde dicha molécula diana es  $\alpha$ -sinucleína o el ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína.

El término "alfa-sinucleína", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido de la familia de miembros de sinucleína ( $\alpha$ -sinucleína,  $\beta$ -sinucleína y  $\gamma$ -sinucleína) que contiene un motivo de unión a lípido alfa helicoidal muy conservado con similitud a los dominios de unión a lípidos de la clase A2 de las apolipoproteínas intercambiables y que son capaces de formar agregados intracelulares conocidos como cuerpos de Lewy que aparecen en ciertas enfermedades neuronales tales como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de cuerpos de Lewy.

Las secuencias de  $\alpha$ -sinucleína humana, de rata, ratón y bovina se proporcionan en la base de datos SwissProt con los números de acceso P37840, P37377, O55042 y Q3T0G8, respectivamente. De forma similar a los ácidos nucleicos que se dirigen al ADN de 5-HT<sub>1A</sub>R, los ácidos nucleicos específicos de  $\alpha$ -sinucleína se pueden identificar o seleccionar usando cualquier método descrito anteriormente y ensayar su capacidad de inducir una inhibición sustancial en los niveles del ARNm correspondiente o la proteína codificada por dicho ARNm. De esta manera, se pueden identificar ácidos nucleicos adecuados específicos de  $\alpha$ -sinucleína como se ha descrito anteriormente midiendo los niveles del ARNm de  $\alpha$ -sinucleína o la proteína  $\alpha$ -sinucleína en células que expresan  $\alpha$ -sinucleína después de haber puesto en contacto dichas células con el ácido nucleico que se va a ensayar.

Típicamente, el ácido nucleico de la invención es capaz de inhibir la función de la molécula diana, es decir, de inhibir la  $\alpha$ -sinucleína. Por tanto, si la molécula diana es el ARNm de  $\alpha$ -sinucleína, entonces el ácido nucleico actúa inhibiendo la traducción del ARNm de  $\alpha$ -sinucleína lo que produce una disminución en los niveles de la proteína  $\alpha$ -sinucleína codificada por el ARNm. Si la molécula diana es la proteína  $\alpha$ -sinucleína, entonces el ácido nucleico (típicamente un aptámero) actúa inhibiendo la actividad de la proteína.

El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que tiene dos o más moléculas de desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos o análogos de nucleótidos así como moléculas que son estructuralmente similares a un ácido nucleico nativo, pero se diferencian del ácido nucleico nativo (por ejemplo, mediante modificación química) en uno o más del esqueleto del ácido nucleico (por ejemplo, fosfato en ácidos nucleicos nativos), azúcar del ácido nucleico (por ejemplo, desoxirribosa para ADN nativo y ribosa en ARN nativo) y base del ácido nucleico (por ejemplo, adenosina, citosina, guanina o timidina en ácidos nucleicos nativos).

El oligonucleótido puede ser un oligonucleótido bicatenario o monocatenario incluyendo, sin limitación, ARN interferente pequeño (ARNip), ARN horquillado corto (ARNhc), microARN (miARN), oligonucleótidos antisentido o ribozimas. Si se usan ácidos nucleicos bicatenarios, estos comprenden una primera hebra sentido que es complementaria al ácido nucleico diana y una segunda hebra antisentido que es complementaria a la primera hebra sentido, que permite la formación del ADN bicatenario mediante la formación de pares de bases de la primera y segunda hebra.

El término "hebra antisentido" se refiere a la hebra de un ácido nucleico bicatenario que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una secuencia diana. Donde la región de complementariedad no es completamente complementaria a la secuencia diana, los malos emparejamientos son más tolerados fuera de los nucleótidos 2-7 del extremo 5' de la hebra antisentido. El término "hebra sentido", como se usa en el presente documento, se refiere a la hebra de un ARNhc que incluye una región que es sustancialmente complementaria a una región de la hebra antisentido.

En una forma de realización particular de la invención, la secuencia de ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador de neurotransmisor se selecciona del grupo que consiste en un gapmero, ARN de interferencia bicatenario, ARN bicatenario con actividad microARN, un oligonucleótido antisentido, un antiMicro ARN, preMicro ARN, un ARNm que codifica microARN o ARNhc, un APN, un ANB, una ribozima y un aptámero.

Un "oligonucleótido antisentido", como se usa en el presente documento, incluye oligonucleótidos antisentido o sentido que comprenden una secuencia de ácido nucleico monocatenario (ya sea ARN o ADN) capaz de unirse a secuencias de ARNm (sentido) o ADN (antisentido) diana. Se describe la capacidad de derivar un oligonucleótido antisentido o sentido, basado en una secuencia de ADNc que codifica una proteína determinada en, por ejemplo, Stein y Cohen, Cancer Res. 48:2659, (1988) y van der Krol et al., BioTechniques 6:958, (1988).

Como se usa en el presente documento, el término "ribozima" o "enzima de ARN" o "ARN catalítico" se refiere a una molécula de ARN que cataliza una reacción química. Muchas ribozimas naturales catalizan la hidrólisis de uno o más sus propios enlaces fosfodiéster o la hidrólisis de enlaces en otros ARN, pero también se ha encontrado que catalizan la actividad aminotransferasa del ribosoma, la actividad ligasa de una ADN ligasa y un número de otras reacciones químicas realizadas por enzimas proteicas convencionales.

Un "aptámero" como se usa en el presente documento, se refiere a un ligando de ácido nucleico que se une a más de un sitio en una molécula diana donde la unión no es "complementaria", es decir, no se debe a la formación de pares de bases entre un ligando ácido nucleico y una secuencia diana de ácido nucleico. Se puede diseñar un aptámero que se una a cualquier diana previsible, incluyendo polipéptidos. Los aptámeros ofrecen la utilidad para aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas ya que ofrecen propiedades de reconocimiento molecular que rivalizan con la de la biomolécula normalmente usada, anticuerpos. Además de su reconocimiento selectivo, los aptámeros ofrecen ventajas sobre los anticuerpos ya que se pueden manipular completamente en un tubo de ensayo y se producen fácilmente mediante síntesis química, poseen propiedades de almacenamiento deseables y provocan poca o ninguna inmunogenicidad en aplicaciones terapéuticas. Los aptámeros se pueden sintetizar mediante rondas repetidas de reparto *in vitro*, selección y amplificación, una metodología conocida en el estado de la técnica como "SELEX" (siglas en inglés de evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) (Shamah et al, Acc. Chem. Res. 2008, 41 pp. 130-8). De forma alternativa, se pueden sintetizar, por ejemplo, mediante fase sólida por etapas.

El ácido nucleico de la invención puede contener una o más modificaciones en las nucleobases, en los azúcares y/o en los enlaces entre nucleótidos.

Las modificaciones a uno o más residuos del esqueleto de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: modificaciones del azúcar en 2' tal como 2'-O-metil (2'-OMe), 2'-O-metoxietil (2'-MOE), 2'-O-metoxietoxi, 2'-fluoro (2'-F), 2'-alil, 2'-O-[2-(metilamino)-2-oxoetil], 2'-O-(N-metilcarbamato); modificaciones del azúcar en 4' incluyendo 4'-tio, puente 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', puente 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2'; ácido nucleico bloqueado (ANB); ácido péptido nucleico (APN); ácido nucleico intercalante (INA); ácido nucleico intercalante enrollado (TINA); ácidos nucleicos de hexitol (HNA); ácido arabinonucleico (ANA); ácidos ciclohexano nucleicos (CNA); ácido ciclohexenilnucleico (CeNA); ácido treosil nucleico (TNA); oligonucleótidos morfolinos; Gap-meros; Mix-meros; incorporación de péptidos ricos en arginina; adición de 5'-fosfato a ARN sintéticos; aptámeros de ARN (Que-Gewirth NS, Gene Ther. Feb 2007;14(4):283-91); aptámeros de ARN regulados con antídotos en el sujeto del aptámero de ARN específico (ref. Oney S, Oligonucleotides. 2007 Fall; 17(3):265-74) o cualquier combinación de los mismos.

Las modificaciones a uno o más enlaces de nucleósidos de los ácidos nucleicos pueden comprender una o más de las siguientes: fosforotioato, fosforamidato, fosforodiamidato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato y fosforanilidato, o cualquier combinación de los mismos.

Un ácido nucleico bloqueado (ANB), con frecuencia denominado ARN inaccesible, es un nucleótido de ARN modificado. El grupo ribosa de un nucleótido ANB se modifica con un puente extra que une los carbonos 2' y 4' (puente O2',C4'-metileno). El puente "bloquea" la ribosa en la conformación estructural 3'-endo, que con frecuencia se encuentra en la forma A del ADN o ARN. Los nucleótidos ANB se pueden mezclar con bases de ADN o ARN en el ácido nucleico cuando se desee. Tales oligómeros están comercialmente disponibles. La conformación bloqueada de la ribosa aumenta el apilamiento de bases y la preorganización del esqueleto. Esto aumenta significativamente la estabilidad térmica (temperatura de fusión) y la afinidad de hibridación de ácidos nucleicos modificados con ANB, además de tener capacidades mejoradas en la discriminación a malos emparejamientos. Estas propiedades los hacen muy útiles para técnicas antisentido. Además, los oligonucleótidos ANB anti-miR se han probado en primates con resultados esperanzadores y baja toxicidad.

Un ácido péptido nucleico (APN) es un polímero artificialmente sintetizado similar a ADN o ARN y se usa en investigación biológica y tratamientos médicos. No se sabe que el APN se produzca de forma natural. El ADN y ARN tienen un esqueleto de azúcar desoxirribosa y ribosa, respectivamente, mientras que el esqueleto de APN está compuesto de unidades repetitivas de N-(2-aminoetil)-glicina unidas por enlaces peptídicos. Las diferentes bases de purina y pirimidina están unidas al esqueleto por enlaces metileno-carbonilo. Los APN se representan como péptidos, con el N-terminal en la primera posición (izquierda) y el C-terminal a la derecha. Puesto que el esqueleto del APN no contiene grupos fosfato cargados, la unión entre las hebras APN/ADN es más fuerte que entre las hebras ADN/ADN debido a la falta de repulsión electrostática. Las moléculas de bases mezcladas de APN son imitadores verdaderos de las moléculas de ADN en términos de reconocimiento de pares de bases. La unión APN/APN es más fuerte que la unión APN/ADN.

Los morfolinos son moléculas sintéticas que son el producto de un rediseño de la estructura natural del ácido nucleico. Estructuralmente, la diferencia entre morfolinos y ADN o ARN es que mientras los morfolinos tienen nucleobases estándar, esas bases están unidas a anillos de 6 miembros de morfolina en lugar de a anillos de desoxirribosa/ribosa y los enlaces fosfordiamidato no iónicos entre las subunidades reemplazan los enlaces fosfodiéster aniónicos. Los morfolinos se denominan algunas veces PMO (oligonucleótido fosfordiamidato de morfolino). El anillo de morfolina de 6 miembros tiene la fórmula química  $O-(CH_2-CH_2)_2-NH$ .

Los gapmeros o "compuestos oligoméricos con huecos" son sondas oligonucleotídicas quiméricas de ARN-ADN-ARN, donde se insertan ventanas o "huecos" ("gaps") de ADN en un oligonucleótido de ARN de otra manera normal o modificado conocidas como "alias". Esta modificación aumenta la estabilidad del oligonucleótido *in vivo* y la avidez de la interacción de la sonda con la diana, de modo que se pueden usar sondas más cortas de forma eficaz. Preferiblemente, las alias son oligonucleótidos 2'-O-metil (OMe) o 2'-O-metoxietil (MOE) modificados que protegen el bloque interno de la degradación por nucleasas. Además, los nucleótidos que forman el hueco o las alias pueden estar unidos por enlaces fosfodiéster o por enlaces fosforotioato, que los hace así resistentes a la degradación por RNasa. Además, los nucleótidos que forman las alias también pueden estar modificados por incorporación de bases unidas por enlaces 3' metilfosfonato.

La expresión "interferencia por ARN" o ARNi es un proceso de represión génica postranscripcional específica de secuencia que se produce en células eucariotas. En general, este proceso implica la degradación de un ARNm de una secuencia particular inducida por ARN bicatenario (ARNbc) que es homólogo a esa secuencia. Este ARNbc es capaz de producir silenciamiento de la expresión génica convirtiendo dicho ARN en ARNi por medio de una RNasa de tipo III (Dicer). Una de las hebras del ARNi se incorpora en un complejo de ribonucleoproteína denominado complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). El complejo RISC usa esta única hebra de ARN para identificar moléculas de ARNm que son al menos parcialmente complementarias a la hebra de ARN del ARNi incorporado en el RISC que se degradan o experimentan una inhibición en su traducción. Por tanto, la hebra del ARNi que se incorpora al RISC se conoce como hebra guía o hebra antisentido. La otra hebra, que se conoce como hebra transitoria o hebra sentido, se elimina del ARNi y es parcialmente homóloga al ARNm diana. La degradación de un ARNm diana mediante el complejo RISC produce una reducción en los niveles de expresión de dicho ARNm y la proteína correspondiente codificada por el mismo. Además, RISC también puede producir la reducción en la expresión por medio de la inhibición de la traducción del ARNm diana.

El ácido nucleico de los conjugados de la invención es capaz de unirse específicamente a la molécula diana  $\alpha$ -sinucleína que se expresa en la misma célula que el transportador del neurotransmisor seleccionado del grupo que consiste en DAT, SERT y NET. La unión del ácido nucleico a la molécula diana se puede producir a través de interacciones de Watson-Crick en donde la molécula diana es un ácido nucleico que contiene una secuencia que es complementaria a la secuencia del ácido nucleico. De forma alternativa, cuando la molécula diana es un polipéptido, el ácido nucleico de los conjugados de la invención también puede interactuar con dicha molécula, en cuyo caso el ácido nucleico actúa como un aptámero.

El ácido nucleico comprendido por el conjugado según la presente invención específicamente se une a alfa-sinucleína en particular una región diana del ARNm de alfa-sinucleína. Por tanto, cuando el ácido nucleico comprendido por el conjugado de la invención se une al ARNm de alfa-sinucleína, dicho ácido nucleico se dirige a una región del ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las



posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4); 499-516 (SEQ ID NO: 5) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7).

Los términos "silenciar" e "inhibir la expresión de", "disminuir la expresión de", "suprimir la expresión de" y similares, en tanto que se refieren a un gen diana, se refieren en el presente documento a la supresión al menos parcial de la expresión de un gen diana, manifestado mediante la reducción de la cantidad de ARNm diana, que se puede aislar de una primera célula o grupo de células en las que se transcribe el gen diana y que se ha o han tratado de modo que se inhibe la expresión de un gen diana, en comparación con una segunda célula o grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o grupo de células pero que no se ha o han tratado (células control). El grado de inhibición normalmente se expresa en términos de:

$$[(\text{ARNm en células control}) - (\text{ARNm en células tratadas}) \times 100 \text{ por ciento}] / (\text{ARNm en células control})$$

De forma alternativa, el grado de inhibición se puede dar en términos de una reducción de un parámetro que está unido funcionalmente a la expresión del gen diana, por ejemplo, la cantidad de proteína codificada por un gen diana o el número de células que muestran un cierto fenotipo. En principio, se puede determinar el silenciamiento del genoma diana en cualquier célula que expresa la diana, ya sea de forma constitutiva o por manipulación genómica, y mediante cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un ácido nucleico determinado inhibe la expresión de un gen diana en un cierto grado y por lo tanto está abarcado por la presente invención, el ensayo proporcionado en los ejemplos posteriores y los conocidos en la técnica sirven como tal referencia. Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión de un gen diana se suprime al menos en aproximadamente el 5 por ciento, el 10 por ciento, el 15 por ciento, el 20 por ciento, el 25 por ciento, el 30 por ciento, el 35 por ciento, el 40 por ciento, el 45 por ciento o el 50 por ciento mediante la administración del oligonucleótido bicatenario. En algunas formas de realización, se suprime un gen diana en al menos aproximadamente el 60 por ciento, el 70 por ciento o el 80 por ciento mediante la administración del oligonucleótido bicatenario. En algunas formas de realización, el gen diana se suprime en al menos aproximadamente el 85 por ciento, el 90 por ciento, o el 95 por ciento mediante la administración del oligonucleótido bicatenario.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico según la presente invención se puede introducir en una célula que expresa el gen diana alfa-sinucleína. El nivel de ARNm del gen diana en la célula se puede detectar usando RT-PCR, transferencia Northern o cualquier otro método estándar. De forma alternativa, el nivel de polipéptido codificado por el ARNm diana se puede medir usando inmunotransferencia, ELISA o cualquier otro método inmunológico o no inmunológico. Un cambio sustancial en el nivel de expresión del ARNm o de la proteína codificada por el gen diana después de la introducción de la secuencia ARNip es indicativo de la eficacia de la secuencia ARNip en suprimir la expresión del gen diana. En un ejemplo específico, los niveles de expresión de otros genes también se controlan antes y después de introducir la secuencia ARNip. Se puede seleccionar una secuencia ARNip que tiene efecto inhibitorio sobre la expresión del gen diana, pero no afecta significativamente la expresión de otros genes. En otro ejemplo específico, se pueden introducir múltiples ARNip u otras secuencias de ARNi en la misma célula diana. Estas secuencias ARNip o ARNi específicamente inhiben la expresión de genes diana, pero no la expresión de otros genes. En aún otro ejemplo específico, se pueden usar ARNip u otras secuencias ARNi que inhiben la expresión del gen diana y de otro gen o genes.

Según la invención, el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm de alfa-sinucleína se dirige a una región del ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4); 499-516 (SEQ ID NO: 5) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7).

En una forma de realización particular del conjugado de la invención, el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína en una región seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4); 499-516 (SEQ ID NO: 5) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7) es un oligonucleótido antisentido o un gapmero.

El oligonucleótido antisentido según la invención inhibe la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica alfa-sinucleína cuya actividad se va a inhibir. Los ácidos nucleicos antisentido se pueden unir a la diana potencial del fármaco por medio de complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN bicatenario mediante la interacción específica en el surco mayor de la doble hélice. En general, estos métodos se refieren a una gama de técnicas generalmente usadas en la técnica e incluyen cualquier método que se base en la unión específica a secuencias de oligonucleótidos.

Una construcción antisentido de la presente invención se puede distribuir, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando se transcribe en una célula, produce ARN complementario a al menos una parte única del

ARNm celular que codifica alfa-sinucleína. De forma alternativa, la construcción antisentido es una sonda oligonucleotídica generada *ex vivo* que, cuando se introduce en la célula, produce la inhibición de la expresión génica hibridando con el ARNm y/o secuencias génicas de un ácido nucleico diana. Tales sondas oligonucleotídicas preferiblemente son oligonucleótidos modificados que son resistentes a nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas y por tanto son estables *in vivo*. Los ejemplos de moléculas de ácido nucleico para el uso de las mismas como oligonucleótidos antisentido son análogos de ADN de fosfaramidato, fosfotionato y metilfosfonato (véase también las patentes en EE UU No. 5176996; 5264564 y 5256775). Además, se han revisado las aproximaciones generales para construir oligómeros útiles en la terapia antisentido, por ejemplo, en Van der Krol et al., *BioTechniques* 6: 958-976, 1988; and Stein et al., *Cancer Res* 48: 2659-2668, 1988.

Preferiblemente, se realizan primero estudios *in vitro* para cuantificar la capacidad de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la expresión génica. Preferiblemente estos estudios usan controles que distinguen entre inhibición génica antisentido y efectos biológicos no específicos de los oligonucleótidos. También preferiblemente estos estudios comparan los niveles de ARN o proteína diana con la de un control interno de ARN o proteína. Los resultados obtenidos usando los oligonucleótidos antisentido se pueden comparar con los obtenidos usando un oligonucleótido control. Preferiblemente el oligonucleótido control tiene aproximadamente la misma longitud que el oligonucleótido que se va a ensayar y la secuencia oligonucleotídica no se diferencia de la secuencia antisentido más de lo que se juzgue necesario para prevenir la hibridación específica a la secuencia diana.

El oligonucleótido antisentido puede ser un ADN o ARN mono o bicatenario o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas de los mismos. El oligonucleótido se puede modificar en el grupo base, el grupo azúcar o el esqueleto de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos unidos, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a los receptores de las células huésped) o agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular (véase, por ejemplo, Letsinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989; Lemaitre et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987; Publicación PCT No. WO 88/09810) o la barrera hematoencefálica (véase, por ejemplo, la Publicación PCT No. WO 89/10134), agentes intercalantes (véase, por ejemplo, Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988). Para este fin, el oligonucleótido se puede conjugar a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, agente de corte desencadenado por hibridación, etc.

Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no está limitado a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener un esqueleto similar a un péptido neutro. Tales moléculas se conocen como oligómeros de ácido péptido nucleico (APN) y se describen, por ejemplo, en Perry-O'Keefe et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996, y en Eglom et al., *Nature* 365: 566, 1993. En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos un esqueleto fosfato modificado. En aún otra forma de realización, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

Mientras que se pueden usar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia de ARNm diana, también se pueden usar los complementarios a la región transcrita no traducida.

En algunos casos, puede ser difícil alcanzar las concentraciones intracelulares suficientes del antisentido para suprimir la traducción del ARNm endógeno. Por tanto, una aproximación preferida usa una construcción de ADN recombinante en la que se coloca el oligonucleótido antisentido bajo el control de un promotor fuerte pol III o pol II. De forma alternativa, se puede reducir la expresión del gen diana dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el promotor y/o los potenciadores) para formar estructuras de hélices triples que previenen la transcripción génica en las células diana en el cuerpo (véase, en general, Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991). En ciertas formas de realización, los oligonucleótidos antisentido son morfollinos antisentido.

Los gapmeros son sondas oligonucleotídicas quiméricas ARN-ADN-ARN, donde se insertan ventanas o "huecos" ("gaps") en un oligonucleótido de ARN de otra forma normal o modificado conocido como "alas". Preferiblemente las alas son ribonucleótidos 2'-O-metil (OMe) o 2'-O-metoxietil (MOE) modificados que protegen el bloque interno de la degradación por nucleasas. Más preferiblemente, las alas son ribonucleótidos 2'-O-metil modificados. Además, los oligonucleótidos que forman el hueco o las alas pueden estar conectados por enlaces fosfodiéster o por enlaces fosforotioato, haciéndolo así resistente a la degradación por RNasa. Además, los nucleótidos que forman las alas también pueden estar modificados incorporando bases unidas por enlaces 3' metilfosfonato.

En una forma de realización preferida particular del conjugado según la invención, el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína en una región seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4), 499-516 (SEQ ID NO: 5) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_00345 (SEQ ID



NO: 7), es un gapmero que comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueado por bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

En una forma de realización más preferida, el gapmero consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

SEQ ID NO 1: cuccAACATTTGTCacuu (ID #1232)  
 SEQ ID NO 2: cuccCTCCACTGTCuucu (ID #1233)  
 SEQ ID NO 3: cugcTCCCTCCACTgucu (ID #1234)

En una forma de realización alternativa del conjugado de la invención, el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína en una región seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4), 499-516 (SEQ ID NO: 5) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_00345 (SEQ ID NO: 7). En particular, el ARN interferente se selecciona del grupo que consiste en ARN interferente pequeño (ARNip), ARN horquillado corto (ARNhc) o micro ARN (miARN).

El término ARN interferente pequeño ("ARNip") se refiere a dúplex de ARN inhibidores pequeños que inducen la ruta de interferencia de ARN. Estas moléculas pueden variar en longitud (generalmente de 18-30 pares de bases) y contienen grados variables de complementariedad a sus ARNm diana en la hebra antisentido. Algunos ARNip, pero no todos, tienen bases no apareadas sobresalientes en el extremo 5' o 3' de la hebra sentido y/o la hebra antisentido. El término "ARNip" incluye dúplex de dos hebras separadas. Como se usa en el presente documento, las moléculas de ARNip no están limitadas a moléculas de ARN, sino que abarcan además ácidos nucleicos con uno o más nucleótidos químicamente modificados, tales como morfolinós.

Un ARNip preferido particular según la invención se dirige a la región en el ARNm de alfa-sinucleína situada en la posición 499-517 en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_00345. Este ARNip tiene la secuencia:

ARNip 499-517 hebra sentido: agaagacaguggagggagcTT (SEQ ID NO:8)  
 ARNip 499-517 hebra antisentido: gcuccuccacugucuuuTT (SEQ ID NO:9)

El término "ARNhc" o "ARN horquillado corto" como se usa en el presente documento, se refiere a un ARNhc donde las dos hebras están unidas por una cadena sin interrumpir de nucleótidos entre el extremo 3' de una hebra y el extremo 5' de la otra hebra respectiva para formar una estructura dúplex.

El término "micro ARN" o "miARN" se refiere a moléculas de ARN monocatenario cortas, típicamente de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud capaces de regular la expresión génica. Los miARN pueden ser sintéticos (es decir, recombinantes) o naturales. Los miARN naturales están codificados por genes que se transcriben del ADN y se procesan de transcritos primarios ("pri-miARN") a estructuras cortas de tallo-bucle ("pre-miARN") y por último a miARN maduro. Las moléculas de miARN maduras son parcialmente complementarias a una o más moléculas de ARNm y disminuyen la expresión génica a través de un proceso similar a la interferencia de ARN o inhibiendo la traducción del ARNm.

En otra forma de realización, el ácido nucleico de los conjugados de la invención es un miARN que es capaz de silenciar específicamente el ARNm de  $\alpha$ -sinucleína. Los miARN específicos de  $\alpha$ -sinucleína adecuados incluyen, sin limitación, miR-7 (véase, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 2009, 106: 13052-13057) y miR-153 (véase, J Biol Chem 2010 285(17): 12726-12734. La secuencia miARN 7-1 humana se localiza en NCBI con el número de acceso NR\_029605 (SEQ ID NO:10), miARN 7-2 humana con el número de acceso NR\_029606 (SEQ ID NO:11) y miARN 7-3 humana con el número de acceso NR\_029607 (SEQ ID NO:12). miARN 153-1 humano se localiza en NCBI con el número de acceso NR\_029688 (SEQ ID NO:13) y miARN 153-2 con el número de acceso NR\_029689 (SEQ ID NO:14).

Un miR-7 según la invención tiene la secuencia:

UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG (SEQ ID NO:15).

Un miR-153 según la presente invención tiene la secuencia:

UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC (SEQ ID NO:16).

Los métodos para el alineamiento por pares de dos secuencias de ácidos nucleicos determinadas los conoce ampliamente el experto en la materia y se pueden llevar a cabo mediante algoritmos estándar del tipo BLASTN [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-

410 (1990)] usando los parámetros por defecto. Los métodos para el alineamiento de múltiples secuencias de ácidos nucleicos se pueden llevar a cabo usando algoritmos estándar del tipo CLUSTALW (Thompson JD et al, Nucleic Acids Res, 1994, 22:4673-4680) usando los parámetros por defecto.

- 5 Cuando el ARN interferente del conjugado de la invención es un ARN interferente bicatenario, el conjugado según la invención puede comprender un agente de selectividad uno o dos agentes de selectividad. En una forma de realización particular, el primer agente de selectividad y el segundo agente de selectividad son el mismo agente de selectividad. En una forma de realización alternativa, el primer agente de selectividad es diferente del segundo agente de selectividad. El segundo agente de selectividad del conjugado de la invención se une específicamente a uno o más transportadores de neurotransmisores seleccionados del grupo que consiste en un transportador de dopamina (DAT), un transportador de serotonina (SERT) o un transportador de norepinefrina (NET), como se ha descrito previamente. Cuando el conjugado según la invención comprende un ARN interferente bicatenario y un agente de selectividad, el agente de selectividad se puede conjugar al extremo 5' de la hebra sentido del ARN interferente o al 5' de la hebra antisentido del ARN interferente. Cuando el conjugado según la invención comprende un ARN interferente bicatenario y dos agentes de selectividad, el primer agente de selectividad se conjuga al extremo 5' de la hebra sentido del ARN interferente y el segundo agente de selectividad se conjuga al 5' de la hebra antisentido del ARN interferente.

- 20 En una forma de realización particular, el conjugado según la invención comprende un ARN interferente, un primer agente de selectividad y un segundo agente de selectividad. En una forma de realización más particular, el segundo agente de selectividad del conjugado se une al extremo opuesto del polinucleótido (ARN interferente) que está unido al primer agente de selectividad. En una forma de realización particular, el segundo agente de selectividad del conjugado se une a un extremo del polinucleótido que es complementario al polinucleótido que está unido al primer agente de selectividad. En una forma de realización particular, el segundo agente de selectividad del conjugado se une al mismo extremo del polinucleótido que está unido al primer agente de selectividad en virtud de un enlazador polifuncional unido a dicho extremo.

### A.3. Regiones enlazadoras de los conjugados de la invención

- 30 El ácido nucleico y el agente de selectividad pueden estar acoplados directamente. Sin embargo, se prefiere que ambas fracciones estén unidas mediante un grupo conector.

- Los términos "grupo conector", "enlazador", "grupo enlazador" y equivalentes gramaticales de los mismos se usan en el presente documento para referirse a un grupo orgánico que une dos partes de un compuesto. El agente de selectividad se puede unir a cualquier nucleótido sentido o antisentido en el ácido nucleico, pero se puede acoplar preferiblemente a través del nucleótido 3' terminal y/o el nucleótido 5' terminal. Un conjugado interno puede estar unido directa o indirectamente a través de un enlazador a una posición 2' del grupo ribosa o a otra posición adecuada.

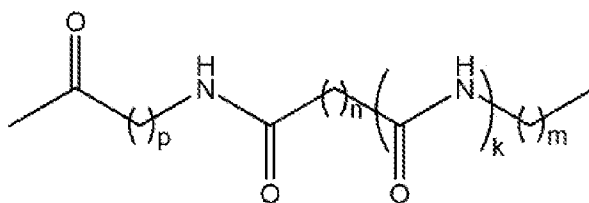
- 40 En el caso en donde el ácido nucleico sea un ácido nucleico bicatenario, el conjugado se puede unir al nucleótido 3' terminal sentido, al nucleótido 5' terminal sentido, al nucleótido 3' terminal antisentido y/o al nucleótido 5' antisentido.

- Aunque sin querer estar limitado por definiciones o convenciones, en esta solicitud la longitud del enlazador se describe contando el número de átomos que representan la distancia más corta entre el átomo que une la fracción del conjugado al enlazador y el átomo de oxígeno de la fracción fosfato terminal asociado con el oligonucleótido a través del cual el enlazador se une al oligonucleótido. En casos donde el enlazador comprende una o más estructuras de anillo, se prefiere contar los átomos alrededor del anillo que representa el camino más corto.

- 50 Los grupos enlazadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, nucleótidos modificados o sin modificar, nucleósidos, polímeros, azúcares, hidratos de carbono, polialquilenos, tales como polietilenglicoles y polipropilenglicoles, polialcoholes, polipropilenos, mezclas de etilen- y propilenglicoles, polialquilaminas, poliaminas tales como polilisina y espermidina, poliésteres tales como poli(acrilato de etilo), polifosfodiésteres, alifáticos y alquilenos. Además, se pueden aplicar enlazadores/químicos de enlazadores que se basan en omega-amino-1,3-dioles, omega-amino-1,2-dioles, hidroxiprolinoles, omega-amino-alcanoles, dietanolaminas, omega-hidroxi-1,3-dioles, omega-hidroxi-1,2-dioles, omega-tio-1,3-dioles, omega-tio-1,2-dioles, omega-carboxi-1,3-dioles, omega-carboxi-1,2-dioles, co-hidroxi-alcanoles, omega-tio-alcanoles, omega-carboxi-alcanoles, oligoetilenglicoles funcionalizados, alil amina, ácido acrílico, alcohol alílico, propargil amina, alcohol propargílico y más, en este contexto para generar enlazadores de la longitud apropiada.

- 60 El enlazador también puede conferir otras propiedades deseables al conjugado de oligonucleótido, solubilidad acuosa mejorada, distancia óptima de separación entre el grupo conjugado y el oligonucleótido, flexibilidad (o falta de la misma), orientación específica, ramificación y otras.

- 65 Preferiblemente, dicho grupo conector tiene la siguiente estructura

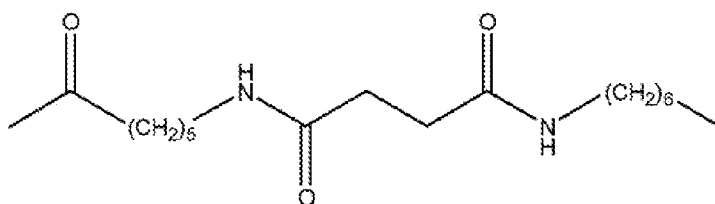


en donde m, n y p se seleccionan de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13,

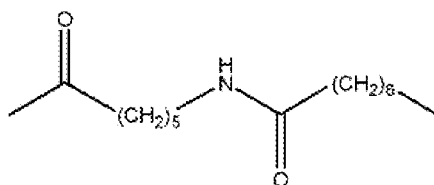
en donde la suma de m+n+p es un número entero seleccionado de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18 y

en donde k es 0 o 1.

En una forma de realización preferida, p es 5, n es 2, k es 1 y m es 6 lo que da un enlazador que tiene la estructura:



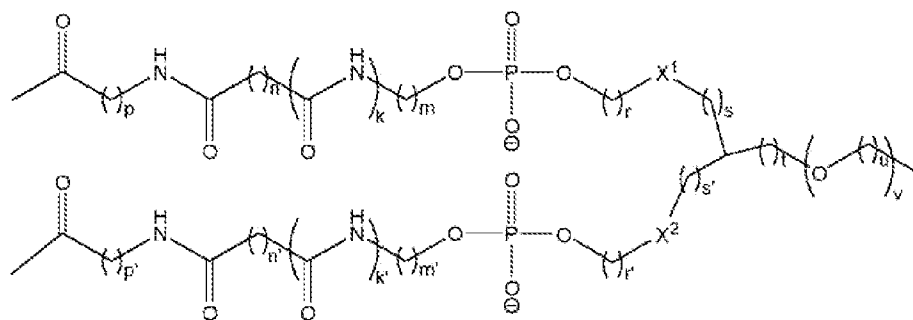
En otra forma de realización preferida, p es 5, n y k son 0 y m es 6 lo que da un enlazador que tiene la estructura:

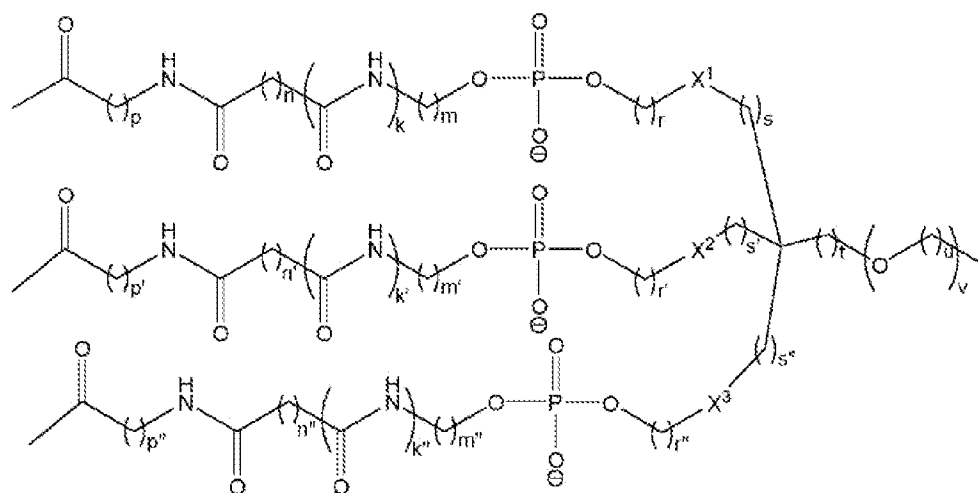


En una forma de realización particular, el enlazador comprende más de un acoplamiento para el agente de selectividad. En una forma de realización preferida, el enlazador es un enlazador bivalente o trivalente, es decir, se pueden acoplar 2 o 3 moléculas de agente de selectividad, respectivamente.

En el caso en donde se acopla más de una molécula de agente de selectividad al ácido nucleico a través de un enlazador, dichas moléculas pueden representar el mismo o diferentes agentes de selectividad.

En una forma de realización particular, el enlazador bivalente o trivalente tiene la siguiente fórmula:





en donde

m, m', m'', n, n', n'', p, p', p'', r, r', r'', s, s', s'', t y u se seleccionan independientemente de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13;

k, k', k'' y v se seleccionan independientemente de 0 y 1; y

X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> se seleccionan independientemente de CH<sub>2</sub>, O, S, NH, CO, C(O)O y C(O)NH.

Dependiendo de los valores de los grupos mencionados anteriormente, los enlazadores ramificados pueden ser simétricos o asimétricos.

En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente como se muestra anteriormente en donde p y p' son 5, n y n' son 2, k y k' son 1 y m y m' son 6. En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n, n', k y k' son 0 y m y m' son 6.

En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente como se muestra anteriormente en donde r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH. En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador bivalente en donde r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub>.

En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n y n' son 2, k y k' son 1, m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH.

En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n y n' son 2, k y k' son 1, m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub>.

En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n, n', k y k' son 0 y m y m' son 6, r y r' son 4, s y s' son 1, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan C(O)NH.

En otra forma de realización el enlazador es un enlazador bivalente en donde p y p' son 5, n, n', k y k' son 0 y m y m' son 6, r es 2, r' es 0, s es 1, s' es 0, t y v son 0 y X<sup>1</sup> y X<sup>2</sup> representan CH<sub>2</sub>.

En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente como se muestra anteriormente en donde p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, k, k' y k'' son 1 y m, m' y m'' son 6. En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n', n'', k, k' y k'' son 0 y m, m' y m'' son 6.

En una forma de realización particular, el enlazador es un enlazador trivalente como se muestra anteriormente en donde r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.

En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.

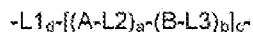
En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, k, k' y k'' son 1, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 0 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.

En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n' y n'' son 2, k, k' y k'' son 1, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.

En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n', n'', k, k' y k'' son 0, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, v es 0 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.

En otra forma de realización, el enlazador es un enlazador trivalente en donde p, p' y p'' son 5, n, n', n'', k, k' y k'' son 0, m, m' y m'' son 6, r, r' y r'' son 3, s, s' y s'' son 1, t es 1, u es 3, v es 1 y X<sup>1</sup>, X<sup>2</sup> y X<sup>3</sup> representan O.

Un grupo enlazador preferido particular según la presente invención tiene la siguiente estructura:



en donde:

A y B representan unidades monoméricas independientemente seleccionadas del grupo que consiste en un monosacárido, una cadena alquilo y un alquilenglicol de (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>);

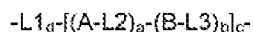
a y b son números enteros que varían de 0 a 50;

c es un número entero que varía de 0 a 30;

L1, L2 y L3 son compuestos enlazadores independientemente seleccionados del grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, carbamato, metilfosfonato, guanidinio, sulfamato, formacetal, tioformacetal, sulfona, amida y mezclas de los mismos; y

d es 0 o 1.

En una forma de realización particular, el grupo enlazador tiene la estructura:



en donde b y d son 0, c es 1, A es una cadena alquilo y L2 es un enlace fosfodiéster

#### A.4. Grupos de direccionamiento de los conjugados de la invención

Otra modificación de los conjugados de la invención implica unir químicamente al ácido nucleico o el grupo protector uno o más grupos o conjugados que aumentan la actividad, distribución celular o absorción celular del ácido nucleico. Tales grupos incluyen, pero no están limitados a grupos lipídicos tales como un grupo colesterol (Letsinger et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 199, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al, Biorg. Med. Chem. Lett., 1994 4 1053-1060), un tioéter, por ejemplo, beril-S-tritilitol (Manoharan et al, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al, Biorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolésterol (Oberhauser et al, Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, por ejemplo, residuos de dodecanodiol o undecilo (Saison-Behmoaras et al, EMBO J, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al, FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietil-amonio (Manoharan et al, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al, Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides and Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), un grupo palmitilo (Mishra et al, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), o un grupo octadecilamina o hexilamino-carboniloxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937).

De forma alternativa, la fracción capaz de aumentar la distribución celular puede ser un compuesto de bajo peso molecular o un polipéptido que es capaz de translocarse específicamente a través de barreras biológicas mediante el uso de endocitosis mediada por receptor usando transportadores específicos presentes en dichas barreras biológicas. En la técnica se conocen una amplia gama de receptores y transportadores de captación, con un número incluso más amplio de ligandos específicos de receptor. Los ligandos preferidos para receptores que median endocitosis y/o transcitosis para su uso según la presente invención incluyen, por ejemplo, ligandos para, o que se unen específicamente a transportador de tiamina, receptor de folato, receptores de vitamina B12, receptores de asialoglucoproteína, receptor de alfa(2,3)-sialoglucoproteína (con por ejemplo, los nanocuerpos FC5 y FC44 que consisten en anticuerpos de dominio único de llama (sdAc) como ligandos específicos de receptores), receptores de transferrina-1 y -2, receptores depuradores (clase A o B, tipos I, II o III o CD36 o CD163), receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL), receptor de la proteína 1 relacionada con LDL (LRP1, tipo B), el receptor LRP2 (también conocido como megalina o glucoproteína 330), receptor de la toxina de la difteria (DTR, que es el precursor unido a membrana del factor de crecimiento similar al factor de crecimiento epidérmico que se une a heparina (HB-EGF)), receptor de insulina, receptores de factores de crecimiento insulinoides (IGF), receptores de leptina, receptor de sustancia P, receptor de glutatión, receptores de glutamato y receptor de manosa-6-fosfato.

Los ligandos preferidos que se unen a estos receptores para su uso según la presente invención incluyen, por ejemplo, ligandos seleccionados del grupo que consiste en: lipoproteína lipasa (LPL), alfa2-macroglobulina (alfa2M), proteína asociada a receptor (RAP), lactoferrina, desmoteplasa, activador de plasminógeno de tipo tisular y uroquinasa (tPA/uPA), inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-I), complejos tPA/uPA:PAI-I, melanotransferrina (o P97), trombospondina 1 y 2, lipasa hepática, inhibidor de la vía factor VIIa/factor tisular (TFPI), factor VIIIa, factor

IXa, Abeta1-40, proteína precursora del beta amiloide (APP), inhibidor C1, complemento C3, apolipoproteína E (apoE), exotoxina A de pseudomonas, CRM66, proteína Tat de VIH-I, rinovirus, metaloproteínasa 9 de matriz (MMP-9), MMP-13 (colagenasa-3), proteína activadora de esfingolípidos (SAP), proteína de la zona de gestación, antitrombina III, cofactor de heparina II, alfa1-antitripsina, proteína de choque térmico 96 (HSP-96), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), apolipoproteína J (apoJ o clusterina), ABETA unida a apoJ y apoE, aprotinina, angio-pep1, lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), transferrina, insulina, leptina, un factor de crecimiento insulinoide, factores de crecimiento epidérmicos, lectinas, peptidomiméticos y/o anticuerpos monoclonales humanizados o péptidos específicos para dichos receptores (por ejemplo, las secuencias HAIYPRH (SEQ ID NO: 17) y THRPPMWSPVWP (SEQ ID NO: 18) que se unen al receptor de transferrina humana o un anticuerpo monoclonal anti-receptor de transferrina humana (TfR) A24), hemoglobina, parte no tóxica de una cadena polipeptídica de la toxina de la difteria, todo o parte de la cadena B de la toxina de la difteria (incluyendo DTB-His (como se describe en Spilsberg et al., 2005, Toxicon., 46(8):900-6)), todo o parte de un mutante no tóxico de la toxina de la difteria CRM197, apolipoproteína B, apolipoproteína E (por ejemplo, después de unirse a recubrimiento de polisorb-80 en nanopartículas), proteína de unión a vitamina D, proteína de unión a vitamina A/retinol, proteína transportadora en plasma de vitamina B12/cobalamina, glutatión y transcobalamina-B12.

En una forma de realización particular, el conjugado de la invención comprende además un grupo que facilita el transporte a través de membranas biológicas del conjugado. Preferiblemente, el grupo es anfipático. Los agentes ejemplares incluyen, sin limitación, penetratina, el fragmento de la proteína Tat que comprende los aminoácidos 48-60, el péptido basado en secuencia señal, PVEC, transportano, péptido modelo anfifílico, Arg9, péptido permeante de la pared celular bacteriana, IL-37, cecropina P1,  $\alpha$ -defensina,  $\beta$ -defensina, bacteneclina, PR-39 e indolicidina. Si el agente es un péptido, se puede modificar, incluyendo un peptidomimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o seudopeptídicos y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipofílica y lipofóbica.

El ligando puede ser un péptido o un peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en el presente documento un oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El péptido o fracción peptidomimética puede tener aproximadamente 5-50 aminoácidos de longitud, por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud (véase, la tabla 4, por ejemplo).

En otra forma de realización particular de la invención, el conjugado de la invención comprende además un ligando endosomolítico. Los ligandos endosomolíticos fomentan la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición de la invención, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido o peptidomimético polianiónico que muestra actividad de membrana y fusogenicidad dependiente de pH. En ciertas formas de realización, el ligando endosomolítico asume su conformación activa al pH endosómico. La conformación "activa" es esa conformación en la que el ligando endosomolítico fomenta la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición de la invención, o sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. Los ligandos endosomolíticos ejemplares incluyen el péptido GAL4 (Subbarao et al., Biochemistry, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel et al., J. Am. Chem. Soc., 1996, 118: 1581-1586), y sus derivados (Turk et al., Biochem. Biophys. Acta, 2002, 1559: 56-68), el péptido IFN-7, el péptido Inf HA-2, el péptido diIFN-7, el péptido diIFN-3, el péptido GLF, el péptido GALA-IFN3 y el péptido IFN-5. En ciertas formas de realización, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (por ejemplo, un aminoácido) que experimentará un cambio en carga o protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado.

#### A.5. Grupos protectores de los conjugados de la invención

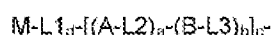
Los ácidos nucleicos que forman parte de los conjugados de la invención se tienen que conservar de factores de degradación, tales como nucleasas (endo/exonucleasas), durante su transporte a través de los diferentes líquidos y compartimentos del organismo. Con este fin, los oligonucleótidos se diseñan para resistir la digestión enzimática y para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad *in vivo* del oligonucleótido. Preferiblemente, los ácidos nucleicos se modifican químicamente mediante la presencia de un grupo que previene la degradación mediada por nucleasas.

Para los fines de la presente invención, "estructura de protección" o "grupo protector" se debe entender que significa modificaciones químicas, que se han incorporado a cualquier extremo del oligonucleótido. Ejemplos no limitantes del 5'-protector incluye residuos (fracción) abásicos invertidos, 4',5'-metilen nucleótido, 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido, 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico, 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótidos; alfa-nucleótidos; nucleótido de base modificada; enlace fosforoditioato; trea-pentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil nucleótido acíclico; 3,5-dihidroxipentil nucleótido acíclico, grupo nucleótido 3'-3'-invertido; grupoabásico 3'-3'-invertido; grupo nucleótido 3'-2'-invertido; grupoabásico 3'-2'; 1,4-butanodiol fosfato; 3'-fosforamidato; hexilfosfato; aminohekil fosfato; 3'-fosfato; 3'-fosforotioato; fosforoditioato; o grupo metilfosfonato con puente o sin puente. Los detalles se describen en el documento WO97/26270, incorporado aquí mediante referencia. El 3'-protector incluye, por ejemplo, 4',5'-metilen nucleótido; 1-(beta-D-eritrofuranosil) nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; 5'-amino-alkil fosfato; 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato; 6-aminohekil

fosfato; 1,2-aminododecil fosfato; hidroxipropil fosfato; 1,5-anhidrohexitol nucleótido; L-nucleótido; alfa-nucleótido; nucleótido de base modificada; fosforoditioato; treo-pentofuranosil nucleótido; 3',4'-seco nucleótido acíclico; 3,4-dihidroxibutil nucleótido; 3,5-dihidroxipentil nucleótido; grupo nucleótido 5'-5'-invertido; grupo abásico 5'-5'-invertido; 5'-fosforamidato; 5'-fosforotioato; 1,4-butanodio fosfato; 5'-amino; 5'-fosforamidato con puente y/o sin puente, fosforotioato y/o fosforoditioato, metilfosfonato con puente o sin puente y grupos 5'-mercapto. Véase también Beaucage e Iyer, 1993, Tetrahedron 49, 1925; cuyo contenido se incorpora aquí mediante referencia. En una forma de realización particular, el grupo protector comprende una fracción de nucleótido invertido. En una forma de realización particular, el grupo protector está localizado en el extremo 3' del oligonucleótido. Los oligonucleótidos antisentido que contienen enlaces terminales 5'-5' o 3'-3' son muy resistentes a la degradación por exonucleasas. Se puede incorporar un nucleótido invertido, tal como dT invertido al extremo 3' del oligonucleótido, lo que produce un enlace 3'-3' que inhibe tanto la degradación por 3' exonucleasas como la extensión por ADN polimerasas.

En una forma de realización particular, el nucleótido invertido se incorpora en el extremo o en los extremos del ácido nucleico de la invención que no está(n) unido(s) al agente de selectividad. En una forma de realización particular, el nucleótido invertido es dT invertida. En una forma de realización preferida particular, el grupo protector se localiza en el extremo o en los extremos del ácido nucleico de la invención que no está(n) unido(s) al agente de selectividad, preferiblemente en el extremo 3', y comprende un grupo de nucleótido invertido, más particularmente dT invertida.

En una forma de realización preferida, la estructura de protección que se une a la secuencia de ácido nucleico de los conjugados de la invención tiene la siguiente estructura general:



en donde:

M es H, una fracción lipídica o un grupo de direccionamiento como se ha definido anteriormente;

A y B representan unidades monoméricas seleccionadas independientemente del grupo que consiste en un monosacárido y un alquilenglicol (C<sub>2</sub>-C<sub>20</sub>);

a y b son números enteros que varían de 0 a 50;

c es un número entero que varía de 0 a 30;

L1, L2 y L3 son compuestos enlazadores seleccionados independientemente del grupo que consiste en fosfodiéster, fosforotioato, carbamato, metilfosfonato, guanidinio, sulfamato, sulfamida, formacetal, tioformacetal, sulfona, amida y mezclas de los mismos;

d es 0 o 1.

Una fracción lipídica, como se usa en el presente documento se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que tiene propiedades lipofílicas o anfipáticas, incluyendo, pero no limitado a, grasas, grasas no volátiles, aceites esenciales, ceras, esteroides, esteroles, fosfolípidos, glucolípidos, sulfolípidos, aminolípidos, cromolípidos (lipocromos) y ácidos grasos. El término "lipido" abarca tanto lípidos naturales como sintéticamente producidos. Las fracciones lipídicas normalmente aumentan las propiedades lipofílicas del oligonucleótido y facilitan la absorción intracelular in vivo de la construcción de nucleótido. Los lípidos adecuados que se pueden usar incluyen ácidos grasos, grasas, aceites, ceras, colesterol, esteroles, vitaminas liposolubles, tales como vitaminas A, D, E y K, monoglicéridos, diglicéridos y fosfolípidos. Los ácidos grasos preferidos son los seleccionados del grupo que consiste en ácido laurico (C12), ácido mirístico (C14), ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), ácido docosanoico (C22) e híbrido de ácido litocólico y oleilamina (litocólico-oleilamina, C43). El experto en la materia puede seleccionar el lípido según las circunstancias considerando el tejido diana, la célula diana, la vía de administración, la vía que se espera que siga el oligonucleótido, etc.

El término "monosacárido", como se usa en el presente documento y es bien conocido en la técnica, se refiere a una forma sencilla de un azúcar que consiste en una única unidad de sacárido que no se puede descomponer más a bloques o fracciones constituyentes de sacáridos más pequeños. Las fracciones de azúcar preferidas para este grupo de conjugación se seleccionan del grupo que consiste en furanosa, fructosa, glucosa, galactosa, manosa, un monosacárido modificado, ácido siálico y eritrosa y mezclas de los mismos. Los monosacáridos pueden estar en sus formas lineales o cíclicas (isómeros hemiacetálicos cíclicos). La furanosa es cualquier azúcar sencillo que contiene un anillo basado en furano de cinco miembros, tal como una D-ribosa o un residuo de fructosa (D-(-)-fructofuranosa). Con la combinación de los monosacáridos, se pueden lograr múltiples estructuras de azúcar. Los fructooligosacáridos (FOS) y los galactooligosacáridos (GOS) son combinaciones de interés especial, así como los disacáridos sacarosa o lactosa; o los polisacáridos inulina, dextrina, almidón o glucógeno.

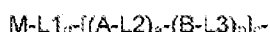
Los términos "alquilenglicol", "poli(alquilenglicol)" y "óxido de alquileo", como se usan en el presente documento, abarcan una familia de polímeros de poliéter que comparten la fórmula general -O-[(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-O]<sub>n</sub>-, en donde m representa el número de grupos metileno presentes en cada unidad de alquilenglicol y n representa el número de unidades de repetición y por lo tanto representa el tamaño o longitud del polímero. El término incluye, sin limitación, etilenglicol, propilenglicol, dialquilenglicol (por ejemplo, dietilenglicol), trialquilenglicol (por ejemplo, trietilenglicol) y glicoles tales como los correspondientes mono- y dialquileteres de los glicoles anteriormente mencionados, en donde los alquileteres son alquileteres inferiores que tienen de 1 a 8 átomos de carbono (por ejemplo, éter de metilo,

etilo, propilo y similares).

En otra forma de realización, tiene una unidad monomérica de alquilenglicol ( $C_2-C_{20}$ ), que puede ser cualquier molécula lineal o ramificada de 2 a 20 átomos de carbono o, dependiendo de los valores de  $a$  y  $b$ , un polímero de polialquilenglicol con varias unidades monoméricas de alquilenglicol ( $C_2-C_{20}$ ). Preferiblemente, el grupo alquilenglicol se selecciona de alquilenglicol  $C_{10}-C_{20}$ . Aún más preferiblemente, el grupo alquilenglicol es un alquilenglicol  $C_{15}$ .

En una forma de realización particular, el conjugado de la invención tiene una estructura de protección en donde  $b$  y  $d$  son 0,  $c$  es 1,  $A$  es una cadena alquilo y  $L2$  es un enlace fosfodiéster.

Los grupos protectores adecuados para los conjugados de la presente invención incluyen, sin limitación:



- PEG + Azúcar, que corresponde a la fórmula anterior en donde  $M$  es H,  $d$  es 0,  $A$  es PEG,  $B$  es un azúcar,  $a$  y  $b$  son cada uno 1 y  $L1$  y  $L2$  son enlaces fosfodiéster;
- PEG + (Azúcar) $_2$ , que corresponde a la fórmula anterior en donde  $A$  es PEG,  $B$  es un azúcar,  $a$  es 1,  $b$  es 2,  $M$  es H y  $d$  es 0 y  $L1$  y  $L2$  son enlaces fosfodiéster;
- (PEG) $_2$  + Azúcar, que corresponde a la fórmula anterior en donde  $A$  es PEG,  $B$  es un azúcar,  $a$  es 2,  $b$  es 1,  $M$  es H y  $d$  es 0 y  $L1$  y  $L2$  son enlaces fosfodiéster;
- (PEG) $_3$  + Azúcar, que corresponde a la fórmula anterior en donde  $A$  es PEG,  $B$  es un azúcar,  $a$  es 3,  $b$  es 1,  $M$  es H y  $d$  es 0 y  $L1$  y  $L2$  son enlaces fosfodiéster;
- (PEG) $_5$  + Azúcar que corresponde a la fórmula anterior en donde  $A$  es PEG,  $B$  es un azúcar,  $a$  es 5,  $b$  es 1,  $M$  es H y  $d$  es 0 y  $L1$  y  $L2$  son enlaces fosfodiéster.

Los términos "PEG" y "azúcar" se usan esencialmente como se ha descrito anteriormente e incluyen furanosa como azúcar y un PEG seleccionado del grupo de espaciadores de  $C_3$ ,  $C_9$  y  $C_{18}$ .

La presente invención también contempla que el conjugado además comprenda un grupo protector unido a un extremo o ambos extremos del polinucleótido que no está unido al agente de selectividad.

#### B. Estructura de los conjugados de la invención

Los diferentes elementos de los conjugados según la presente invención se pueden organizar de diferentes maneras, que forman parte de la presente invención. De este modo, el agente de selectividad se puede acoplar al extremo 5' y/o al extremo 3' del ácido nucleico. Preferiblemente, el agente de selectividad está acoplado al extremo 5' del ácido nucleico. Además, el ácido nucleico y el agente de selectividad pueden estar unidos directamente o pueden estar conectados por un enlazador. De forma similar, el enlazador puede estar acoplado al extremo 5' y/o al extremo 3' del ácido nucleico. Preferiblemente, el enlazador está acoplado al extremo 5' del ácido nucleico. De esta manera, en donde el ácido nucleico de la invención contiene una cadena única de ácido nucleico, las posibles organizaciones son:

- un ácido nucleico que comprende un agente de selectividad unido al extremo 5'
- un ácido nucleico que comprende un agente de selectividad unido al extremo 3',
- un ácido nucleico que comprende un agente de selectividad unido al 5' y un grupo protector unido al extremo 3' y
- un ácido nucleico que comprende un grupo protector unido al extremo 5' y un agente de selectividad unido al extremo 3'.
- un ácido nucleico modificado que comprende un primer y segundo agentes de selectividad, dichos primer y segundo agentes de selectividad son iguales o diferentes, ambos agentes de selectividad unidos a los dos extremos de un enlazador bifuncional que está unido al extremo 5' del ácido nucleico,
- un ácido nucleico modificado que comprende un primer y segundo agentes de selectividad, dichos primer y segundo agentes de selectividad son iguales o diferentes, ambos agentes de selectividad unidos a los dos extremos de un enlazador bifuncional que está unido al extremo 3' del ácido nucleico,
- un ácido nucleico modificado que comprende cuatro agentes de selectividad, dichos agentes de selectividad son iguales o diferentes, en donde dos de los agentes de selectividad están unidos a ambos extremos de un primer enlazador bifuncional que está unido al extremo 5' del ácido nucleico y en donde dos de los agentes de selectividad están unidos a ambos extremos de un segundo enlazador bifuncional que está unido al extremo 3' del ácido nucleico.

En una forma de realización preferida, en donde el conjugado contiene una única cadena de ácido nucleico y dos agentes de selectividad, el primer agente de selectividad y el segundo agente de selectividad son ambos un inhibidor triple de recaptación (preferiblemente indatralina) y están unidos a los extremos 5' y 3' del ácido nucleico.



En otra forma de realización, el ácido nucleico puede contener más de un ligando unido a un extremo de la molécula de ácido nucleico en virtud de un enlazador multifuncional. Por tanto, en otra forma de realización, el ácido nucleico puede contener un enlazador bifuncional unido al extremo 5', en donde cada extremo del enlazador bifuncional está acoplado a un inhibidor triple de recaptación que tiene la estructura (I) como se ha definido anteriormente (preferiblemente indatralina). En otra forma de realización, el ácido nucleico contiene un enlazador trifuncional unido al extremo 5' o 3', en donde cada extremo del enlazador trifuncional está unido a un ligando. En una forma de realización preferida, los tres extremos del enlazador trifuncional están unidos a inhibidores triples de recaptación que tienen la estructura (I) como se ha definido anteriormente, que pueden ser iguales o diferentes. En una forma de realización preferida, la molécula de ácido nucleico está unida a tres moléculas de indatralina.

Además, el conjugado de la invención puede contener más de una cadena de ácido nucleico que module la expresión de la molécula diana. Por ejemplo, una construcción de esta invención puede contener hasta cinco ácidos nucleicos diferentes unidos en tándem mediante fosfodiésteres dirigidos a diferentes regiones de una molécula diana determinada.

Además, en esos casos en donde el ácido nucleico es un ácido nucleico bicatenario, el agente de selectividad se puede acoplar a la hebra sentido y/o antisentido y puede estar directamente acoplado o conectado por un grupo enlazador.

Los ácidos nucleicos que forman parte de los conjugados de la invención se tienen que proteger de factores de degradación, tales como nucleasas (endo/exonucleasas), durante su transporte a través de diferentes líquidos y compartimentos del organismo. Con este propósito, los oligonucleótidos se diseñan para resistir la digestión enzimática y para mejorar la estabilidad y biodisponibilidad *in vivo* del oligonucleótido. Las exonucleasas celulares usan extremos 5' libres como dianas. De esta manera, en el caso de ácidos nucleicos monocatenarios, el agente de selectividad puede actuar como un grupo estabilizante cuando está acoplado al 5' del ácido nucleico. Sin embargo, en el caso de conjugados que comprenden ácidos nucleicos bicatenarios o un ácido nucleico monocatenario en el que el agente de selectividad está unido al extremo 3', el conjugado puede comprender además un grupo estabilizante o estructura protectora que normalmente es un grupo que previene la degradación del ácido nucleico por la actividad de exonucleasas. En el caso de ácidos nucleicos bicatenarios, existen las siguientes posibles organizaciones:

- [1] el agente de selectividad está unido al extremo 5' de una de las hebras, en cuyo caso es útil unir una estructura protectora al extremo 5' de la hebra opuesta. Además, también puede estar presente una estructura protectora en uno o dos de los extremos 3'.
- [2] el agente de selectividad está unido al extremo 3' de una de las hebras, en cuyo caso es útil unir una estructura protectora a los extremos 5' de las hebras sentido y antisentido. Además, una estructura protectora puede estar presente en el extremo 3' libre.
- [3] el conjugado comprende más de un agente de selectividad que puede ser el mismo o diferente en cuyo caso los agentes de selectividad están acoplados a los extremos 5' de la hebra sentido y la antisentido. Opcionalmente, una estructura protectora puede estar acoplada a uno o dos de los extremos 3' libres.

En una forma de realización preferida, el ácido nucleico es un ARN bicatenario en donde el agente de selectividad está unido al extremo 5' de la hebra antisentido y el grupo protector está unido al extremo 5' de la hebra sentido. En una forma de realización aún más preferida, el grupo protector tiene la estructura



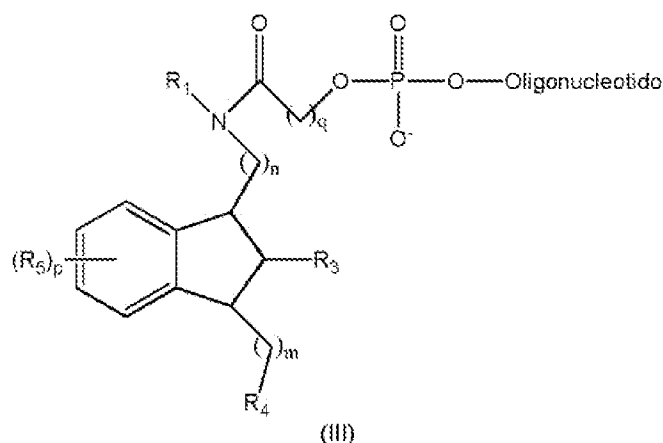
en donde M es H, d es 0, A es un espaciador de C18 de polietilenglicol, B es una furanosa, a es 2, b y c son 1 y L2 y L3 son enlaces fosfodiéster.

En otra forma de realización, el ácido nucleico puede contener más de un ligando unido a un extremo de las hebras de ácido nucleico en virtud de un enlazador multifuncional. Preferiblemente, los ligandos están unidos a los extremos 5' de las hebras sentido o antisentido. Por tanto, en otra forma de realización, el ácido nucleico puede contener un enlazador bifuncional unido al extremo 5' de la hebra sentido, en donde cada extremo del enlazador bifuncional está acoplado a un inhibidor triple de recaptación que tiene la estructura (I) como se ha definido anteriormente (preferiblemente indatralina). En otra forma de realización, el ácido nucleico puede contener un enlazador bifuncional unido al extremo 5' de la hebra antisentido, en donde cada extremo del enlazador bifuncional está acoplado a un inhibidor triple de recaptación que tiene la estructura (I) como se ha definido anteriormente (preferiblemente indatralina).

En otra forma de realización, el ácido nucleico contiene un enlazador trifuncional unido al extremo 5' o 3' de o bien la hebra sentido, la hebra antisentido o ambas, en donde cada extremo del enlazador trifuncional está unido a un ligando. En una forma de realización preferida, los tres extremos del enlazador trifuncional están unidos a inhibidores triples de recaptación que tienen la estructura (I) como se ha definido anteriormente, que pueden ser iguales o

diferentes. En una forma de realización preferida, el extremo 5' de la hebra sentido del ácido nucleico está unido a tres moléculas de indatralina.

En una forma de realización más preferida, el conjugado de la invención tiene la estructura (III)



en donde

n o m son números enteros que cada uno tiene un valor entre 0 y 6, inclusive;

p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;

q es un número entero que tiene un valor entre 0 y 20 inclusive;

R<sub>1</sub> es hidrógeno, alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; -C(=O)R<sub>A</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>; -C(=O)N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>A</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio;

R<sub>3</sub> es hidrógeno, halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; -OR<sub>C</sub>; -C(=O)R<sub>C</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>C</sub>; -SOR<sub>C</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>C</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>C</sub>; -OC(=O)R<sub>C</sub>; -OC(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)OR<sub>C</sub>; o -C(R<sub>C</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>C</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio;

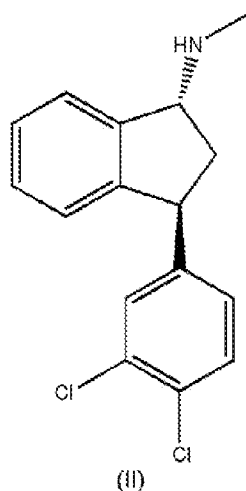
R<sub>4</sub> es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado;

R<sub>5</sub> es hidrógeno, halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; -OR<sub>E</sub>; -C(=O)R<sub>E</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>E</sub>; -SOR<sub>E</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>E</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>E</sub>; -OC(=O)R<sub>E</sub>; -OC(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)OR<sub>E</sub>; o -C(R<sub>E</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>E</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo.

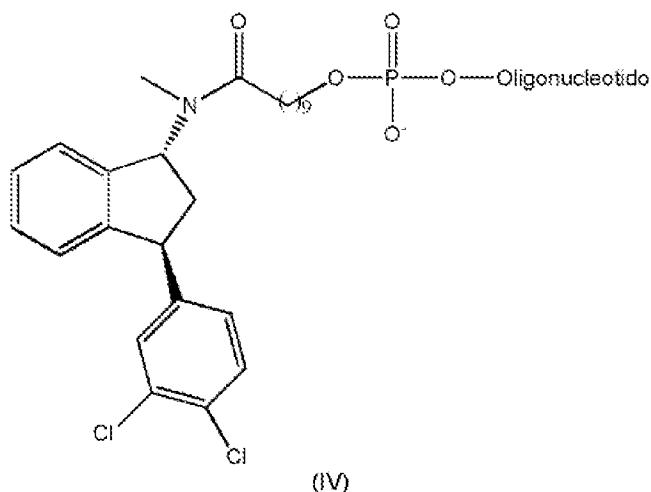
En una forma de realización del conjugado de la invención, el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido o un gapmero. En una forma de realización preferida, el gapmero del conjugado de la invención comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueado por 2 bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

En una forma de realización preferida particular del conjugado según la invención, el oligonucleótido que es capaz de unirse específicamente al ARNm que codifica α-sinucleína en una región seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4), 499-516 (SEQ ID NO:5) y 502-519 (SEQ ID NO:6) del ARNm de la alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO:7). En una forma de realización más preferida, el gapmero consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En una forma de realización particular del conjugado de la invención, el agente de selectividad tiene la estructura (II):

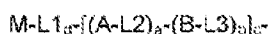


5 En una forma de realización preferida, el conjugado de la invención tiene la siguiente estructura (IV):



10 en donde el oligonucleótido comprende un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína en una región seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO: 4), 499-516 (SEQ ID NO:5) y 502-519 (SEQ ID NO:6) del ARNm de la alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO:7). En una forma de  
15 realización particular, el oligonucleótido tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

En aún otra forma de realización preferida, el conjugado de la invención comprende un ácido nucleico bicatenario en donde el extremo 5' de la hebra sentido está acoplado al grupo protector y el extremo 5' de la hebra antisentido está  
20 acoplado al agente de selectividad y en donde el grupo protector tiene la estructura:



25 en donde M es H, d es 0, A es un espaciador de C18 de polietilenglicol, B es una furanosa, a es 2, b y c son 1 y L2 y L3 son enlaces fosfodiéster.

En el sentido de la invención, el grupo protector puede estar unido a los grupos 5'-OH o 3'-OH del oligonucleótido por medio del compuesto enlazador.

30 Por ejemplo, es posible unir en una única molécula de oligonucleótido un número variable de grupos de fórmula (II), típicamente de 2 a 4, dependiendo de si el oligonucleótido es bicatenario o monocatenario siempre que la unión se haga a través del 5'-OH y/o 3'-OH. También es posible que una cadena de varios grupos de fórmula (I) se unan al oligonucleótido, dichos grupos de fórmula (I) están unidos entre si por medio de compuestos enlazadores, tales como los derivados de fosforamidita que producen un enlace fosfodiéster entre las moléculas y/o el oligonucleótido.

Además, la construcción de oligonucleótido puede contener una cadena de varios grupos de fórmula (I) unidos a un extremo del oligonucleótido y otro grupo de fórmula (I) unido al otro extremo del oligonucleótido.

Además, las construcciones de oligonucleótido de la invención pueden contener más de un agente de direccionamiento, distribuidos con todas las combinaciones posibles entre los extremos 5'-OH y 3'-OH de las dos hebras del oligonucleótido o unidos al grupo de fórmula (I). Además, si hay más de un agente de direccionamiento, estos pueden estar unidos en tándem al grupo de fórmula (I) y/o al oligonucleótido.

Si la construcción de oligonucleótido contiene más de un agente de direccionamiento, son posibles diferentes combinaciones. Por ejemplo, el grupo protector se puede unir a los grupos terminales 5'-OH o 3'-OH de una de las hebras del oligonucleótido. Otra combinación posible incluye un fármaco unido al grupo 5'-OH de una hebra del oligonucleótido y una serie de aptámeros unidos a la unidad terminal del grupo de fórmula (I) que se une a la otra hebra del oligonucleótido.

### 15 C. Composiciones farmacéuticas de la invención

Los inventores han encontrado que los conjugados de la invención tienen la capacidad de modular la expresión del ARNm de alfa-sinucleína que es diana de las secuencias de ácido nucleico de los conjugados de la invención. En particular, los conjugados que comprenden gapmeros que se dirigen a las regiones 448-468 (SEQ ID NO:4), 499-516 (SEQ ID NO:5) y 502-519 (SEQ ID NO:6) del ARNm de alfa-sinucleína humana como en el número de acceso de NCBI NM\_000345 pueden inducir de forma eficaz una reducción de la expresión de alfa-sinucleína en los bulbos olfativos (BO), sustancia negra (SNc/MTA), rafe dorsal (DR) (véase el ejemplo 3 y la figura 4).

De esta manera, el experto en la materia apreciará que los conjugados de la invención son adecuados para el tratamiento de enfermedades que se pueden beneficiar de la reducción en los niveles de expresión de los genes que son diana de los ácidos nucleicos presentes en los conjugados de la invención, es decir, los niveles de expresión de alfa-sinucleína. De esta manera, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado según la invención para su uso en medicina. De forma alternativa, la invención se refiere al uso de un conjugado según la invención para la fabricación de un medicamento. Además, la invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un conjugado según la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se pueden formular cantidades apropiadas de las construcciones de oligonucleótido de la invención con excipientes y/o soportes farmacéuticamente aceptables para obtener una composición farmacéutica. Una composición que incluye un conjugado según la invención se puede administrar a un sujeto por varias vías. Las vías ejemplares incluyen, administración intraes-tral, intracerebroventricular, intratecal, intraparenquimatos-a (por ejemplo, en el cuerpo estriado), intranasal y ocular. La composición también se puede administrar de forma sistémica, por ejemplo, mediante inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular, que es particularmente útil para la administración de los conjugados a neuronas periféricas. Además, también es posible administrar los conjugados de la invención por vía intranasal lo que permite la administración sistémica mediante un modo de administración no agresivo. Además, la administración intraventricular también puede ser adecuada. Una vía preferida de administración es directamente en el cerebro, por ejemplo, en los ventrículos o el hipotálamo del cerebro, o en las áreas lateral o dorsal del cerebro.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender una pluralidad de conjugados diferentes, en donde los diferentes conjugados comprenden ácidos nucleicos que se dirigen a diferentes regiones de la misma molécula diana. Por tanto, las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6 y más conjugados diferentes que comprende cada uno un ácido nucleico diferente.

Los expertos en la materia son familiares con los principios y procedimientos discutidos en fuentes ampliamente conocidas y disponibles como Remington's Pharmaceutical Science (17ª Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1985) y Goodman y Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics (8ª Ed., Pergamon Press, Elmsford, N.Y., 1990) los cuales se incorporan en el presente documento mediante referencia.

En una forma de realización preferida de la presente invención, los conjugados se formulan según un procedimiento estándar como una composición farmacéutica adaptada para la administración a seres humanos y otros mamíferos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa o intraventricular son soluciones en tampones acuosos isotónicos estériles.

Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local para aliviar cualquier dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se suministran por separado o mezclados en una forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo seco liofilizado o concentrado sin agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de principio activo. Donde la composición se va a administrar mediante infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contiene agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Donde la composición se administra mediante inyección, se puede suministrar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

En casos diferentes de la administración intravenosa, la composición puede contener cantidades menores de agentes humectantes o emulsionantes o agentes reguladores del pH. La composición puede ser una solución líquida, suspensión, emulsión, gel, polímero o formulación de liberación sostenida. La composición se puede formular con los aglutinantes y soportes tradicionales, como se sabe en la técnica. Las formulaciones pueden incluir soportes estándar tales como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacárido de sodio, celulosa, carbonato de magnesio etc., de grado farmacéutico, soportes inertes que tienen funcionalidad bien establecida en la fabricación de fármacos. Se conocen varios sistemas de administración y se pueden usar para administrar un agente terapéutico de la presente invención incluyendo encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas y similares.

En aún otra forma de realización preferida, los agentes terapéuticos que contienen los conjugados de la invención se pueden formular como formas neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con grupos amino libres tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico y similares, y las formadas con grupos carboxilo libres tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaina o similares.

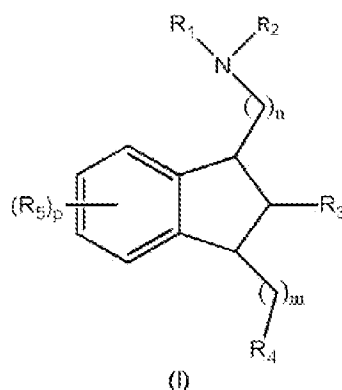
#### D. Usos terapéuticos de los conjugados de la invención

Los conjugados de la invención se pueden usar para el tratamiento de cualquier enfermedad que se pueda mejorar atenuando el gen de alfa-sinucleína en una célula que expresa un transportador de neurotransmisor seleccionado del grupo de DAT, SERT y NET. El experto en la materia entenderá que los conjugados son útiles para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por la expresión anormal de la proteína alfa-sinucleína en una célula (por ejemplo, acumulación de  $\alpha$ -sinucleína en cuerpos de Lewy) o para enfermedades en donde la proteína alfa-sinucleína se expresa a niveles normales, pero que se pueden mejorar disminuyendo la expresión de dicha proteína diana.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un conjugado de la invención que comprende

- (i) al menos un agente de selectividad que es un inhibidor triple de recaptación (IRSND) y
- (ii) al menos un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador de neurotransmisor en donde dicha molécula diana es  $\alpha$ -sinucleína o el ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína

en donde el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm de alfa-sinucleína se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las posiciones 499-516 (SEQ ID NO: 5), 448-465 (SEQ ID NO: 4) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína definida en el número de acceso del NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7) y en donde el inhibidor de recaptación triple tiene la siguiente estructura (I)



en donde

n o m son números enteros que tiene cada uno un valor entre 0 y 6, inclusive;

p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;

R<sub>1</sub> es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; aro sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; -C(=O)R<sub>A</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>; -C(=O)N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada aparición de R<sub>A</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción

arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

$R_2$  es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-C(=O)R_A$ ;  $-CO_2R_A$ ;  $-C(=O)N(R_A)_2$  o  $-C(R_A)_3$ ; en donde cada aparición de  $R_A$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

$R_3$  es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-OR_C$ ;  $-C(=O)R_C$ ;  $-CO_2R_C$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_C$ ;  $-SOR_C$ ;  $SO_2R_C$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_C)_2$ ;  $-NHC(=O)R_C$ ;  $-NR_CC(=O)N(R_C)_2$ ;  $-OC(=O)OR_C$ ;  $-OC(=O)R_C$ ;  $-OC(=O)N(R_C)_2$ ;  $-NR_CC(=O)OR_C$ ; o  $-C(R_C)_3$ ; en donde cada aparición de  $R_C$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio;

$R_4$  es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;

$R_5$  es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-OR_E$ ;  $-C(=O)R_E$ ;  $-CO_2R_E$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_E$ ;  $-SOR_E$ ;  $SO_2R_E$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_E)_2$ ;  $-NHC(=O)R_E$ ;  $-NR_EC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-OC(=O)OR_E$ ;  $-OC(=O)R_E$ ;  $-OC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-NR_EC(=O)OR_E$ ; o  $-C(R_E)_3$  en donde cada aparición de  $R_E$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo

para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy.

El término "enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy" se refiere a una afección que se caracteriza por trastornos en el metabolismo de alfa-sinucleína, que da lugar a la formación de inclusiones anormales de alfa-sinucleína. Más en particular los trastornos de cuerpos de Lewy incluyen la enfermedad de Parkinson (EP), demencia con cuerpos de Lewy (DCL), EP con demencia (EPD) y atrofia multisistémica. En una forma de realización particular, la enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy se selecciona del grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica.

La enfermedad de Parkinson (EP) es un trastorno degenerativo del sistema nervioso central que con frecuencia altera las capacidades motoras, el habla y otras funciones del paciente. Los síntomas de la enfermedad de Parkinson resultan de la actividad muy reducida de células dopaminérgicas en la región pars compacta de la sustancia negra (SNpc). Estas neuronas se proyectan al cuerpo estriado y su pérdida produce alteraciones en la actividad de circuitos neuronales en los ganglios basales que regulan el movimiento, en esencia una inhibición de la vía directa y excitación de la vía indirecta. La vía directa facilita el movimiento y la vía indirecta inhibe el movimiento, por tanto, la pérdida de estas células produce un trastorno de movimiento hipocinético. La falta de dopamina produce una inhibición aumentada de núcleo anterior ventral del tálamo, que envía proyecciones excitadoras a la corteza motora, lo que produce hipocinesia.

La EP se caracteriza por una pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la SNpc y la presencia de inclusiones intracelulares designadas como cuerpos de Lewy (LB). Neuroquímicamente, la EP está marcada por disfunción del complejo mitocondrial I e índices aumentados de estrés oxidativo. Se han propuesto varios mecanismos patogénicos para la EP incluyendo estrés oxidativo y nitrosativo, disfunción mitocondrial, mal plegamiento y agregación de proteínas, y apoptosis. La EP es mayoritariamente esporádica, pero se ha mostrado que algunos de los casos de EP son familiares. El primer gen de EP familiar identificado fue  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin) que de hecho es el componente principal de los LB en todos los pacientes de EP. La función normal de  $\alpha$ -sinucleína se entiende mal.  $\alpha$ -Sinucleína se puede unir a lípidos y, en neuronas, se asocia con vesículas presinápticas y la membrana plasmática, posiblemente a través de balsas lipídicas. Las formas patológicas depositadas de  $\alpha$ -sinucleína se agregan y muestran menor solubilidad que la proteína normal. Se han descrito tres mutaciones puntuales que causan EP familiar, pero también se ha descrito que duplicaciones y triplicaciones del gen *SNCA* son responsables de EP y enfermedad de cuerpos de Lewy. Por tanto, incluso sin variantes de secuencia, la dosis de  $\alpha$ -sinucleína puede ser causante para la enfermedad de cuerpos de Lewy.

La demencia con cuerpos de Lewy (DLB) también se conoce como demencia de cuerpos de Lewy, enfermedad difusa de cuerpos de Lewy, enfermedad cortical de cuerpos de Lewy o demencia senil de tipo Lewy. Esta enfermedad está estrechamente relacionada con las enfermedades de Alzheimer y Parkinson y se caracteriza

anatómicamente por la presencia de cuerpos de Lewy, que son masas de alfa-sinucleína y proteína ubiquitina en neuronas detectables en histología cerebral post mortem.

La atrofia multisistémica o MSA es un trastorno neurodegenerativo asociado con la degeneración de células nerviosas en áreas específicas del cerebro. Como resultado de la degeneración celular, surgen en el paciente problemas con el movimiento, equilibrio y otras funciones autonómicas del cuerpo tales como control de la vejiga o tensión sanguínea.

En una forma de realización preferida particular, el conjugado según la invención se administra por vía intraventricular o intranasal.

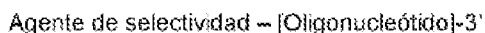
#### E. Síntesis de los conjugados de la invención

Los conjugados de la invención típicamente se sintetizan usando procedimientos estándar en síntesis orgánica. El experto en la materia apreciará que las etapas exactas de la síntesis dependerán de la estructura exacta del conjugado que se tiene que sintetizar. Por ejemplo, si el conjugado comprende una sola hebra de ácido nucleico conjugada con el agente de selectividad a través de su extremo 5', entonces normalmente la síntesis se lleva a cabo poniendo en contacto un oligonucleótido aminoactivado y un reactivo de selectividad activado por un reactivo.

En donde el conjugado comprende un ácido nucleico bicatenario, entonces se sintetizan las hebras sentido y antisentido por separado y se hibridan *in vitro* usando procedimientos estándar de biología molecular. En un conjugado típico, la primera de las hebras del ácido nucleico lleva el agente de selectividad y la segunda hebra de ácido nucleico lleva un grupo protector. En una forma de realización aún más preferida, el agente de selectividad se acopla al extremo 5' de la primera hebra de ácido nucleico y/o el grupo protector se une al extremo 5' de la segunda hebra de ácido nucleico, aunque la unión del agente de selectividad o del grupo protector también se puede llevar a cabo en los extremos 3' de las hebras de ácidos nucleico.

La síntesis de los conjugados se puede llevar a cabo como sigue:

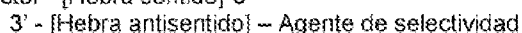
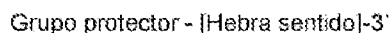
[1] Los conjugados que tienen la estructura



se sintetizan típicamente usando las siguientes etapas:

- (i) Activación del agente de selectividad. Preferiblemente, el grupo activador en el agente de selectividad es un grupo succinimida o un grupo amino. Si el agente de selectividad tiene una amina primaria o secundaria, puede que la activación no se necesite ya que el oligonucleótido activado puede reaccionar con el grupo amino en el agente de selectividad.
- (ii) Activación del oligonucleótido en su extremo 5'. Preferiblemente el grupo de activación en el oligonucleótido es un grupo amino (en donde el agente de selectividad se ha activado mediante un grupo succinimida) o un grupo carboxilo (en donde el agente de selectividad se ha activado mediante un grupo amina o contiene un grupo amina) y
- (iii) poner en contacto el agente de selectividad activado con el oligonucleótido activado en condiciones adecuadas para la reacción entre los dos grupos de activación.

[2] Los conjugados que tienen la estructura



típicamente se sintetizan usando las siguientes etapas:

- (i) Activación del agente de selectividad. Preferiblemente, el grupo activador en el agente de selectividad es un grupo succinimida o amino;
- (ii) Activación de la hebra sentido en su extremo 5'. Preferiblemente, el grupo de activación en el oligonucleótido es un grupo amino (en donde el agente de selectividad se ha activado mediante un grupo succinimida) o un grupo carboxilo (en donde el agente de selectividad se ha activado mediante un grupo amina o contiene un grupo amina);
- (iii) Poner en contacto el agente de selectividad activado con la hebra sentido activada en condiciones adecuadas para la reacción entre los dos grupos de activación
- (iv) Añadir el grupo protector a la hebra antisentido inmovilizada. Esta etapa preferiblemente se lleva a cabo usando un oligonucleótido cuyos grupos reactivos están bloqueados mediante acetilación o bencilación (los grupos furanosos), 2-cianoetilación (los enlaces fosfodiéster) y FMOC (los grupos amino exocíclicos).
- (v) Hibridación de las hebras sentido y antisentido

Los conjugados de la invención se pueden preparar usando técnicas que conocen los expertos en la materia. La síntesis de conjugados puede implicar la protección y desprotección selectiva de grupos funcionales. Los grupos protectores adecuados los conoce bien el experto en la materia. Por ejemplo, se proporciona una revisión general de grupos protectores en química orgánica en Wuts, P.G.M. y Greene T.W. en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (4ª Ed. Wiley-Interscience), y en Kocienski P.J. en *Protecting Groups* (3ª Ed. Georg Thieme Verlag).

En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen los significados detallados a continuación:

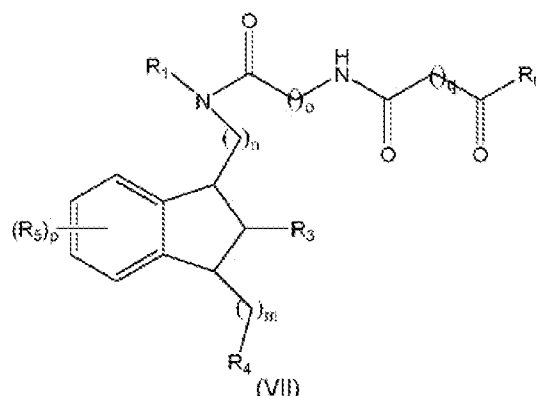
- El término "alquilo de C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>" se refiere a un radical de hidrocarburo lineal o ramificado que consiste en átomos de carbono e hidrógeno, que no contiene insaturaciones, que tiene de uno a seis, preferiblemente de uno a tres (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>3</sub>) átomos de carbono y está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. Ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero no están limitados a grupos alquilo tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, t-butilo, pentilo y hexilo. Preferiblemente alquilo se refiere a metilo.
- El término "halógeno" se refiere a bromo, cloro, yodo o flúor.
- El término "haloalquilo" se refiere a un grupo alquilo como se ha definido anteriormente en donde al menos un átomo de hidrógeno se ha cambiado por halógeno. Ejemplos de grupos haloalquilo incluyen, pero no están limitados a CF<sub>3</sub>, CCl<sub>3</sub>, CHF<sub>2</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>. Preferiblemente haloalquilo se refiere a CF<sub>3</sub>.
- El término "arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>" se refiere a un grupo aromático que tiene entre 6 y 10 átomos de carbono, que comprende 1 o 2 núcleos aromáticos, unido por medio de un enlace carbono-carbono o fusionado, incluyendo por ejemplo fenilo, naftilo y difenilo. Preferiblemente "arilo" se refiere a fenilo.
- El término "heterociclilo" se refiere a un radical anillo estable de 3 a 10 miembros, preferiblemente un anillo de 5 o 6 miembros, que consiste en átomos de carbono y de uno a cinco heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno y azufre y que puede estar parcial o totalmente saturado o ser aromático ("heteroarilo"). Para los fines de esta invención, el heterociclo puede ser un sistema de anillos monociclilo, biciclilo o triciclilo, que puede incluir sistemas de anillos fusionados. En una forma de realización particular, el grupo heterociclilo es succinimida.

Los compuestos de la presente invención representados mediante la anteriormente descrita fórmula (III) pueden incluir estereoisómeros dependiendo de la presencia de centros quirales. Los isómeros únicos, enantiómeros o diastereoisómeros y mezclas de los mismos están en el ámbito de la presente invención.

A menos que se indique de otra manera, se pretende que los compuestos usados en la invención incluyan compuestos que solo se diferencian en la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, compuestos que tienen las estructuras presentes excepto por la sustitución de un hidrógeno con deuterio o tritio o la sustitución de un carbono con un carbono enriquecido en <sup>13</sup>C o <sup>14</sup>C o un nitrógeno enriquecido en <sup>15</sup>N están dentro del ámbito de la invención.

#### Síntesis usando un ácido nucleico amino-derivado y un inhibidor triple de recaptación activado

En una primera forma de realización, los conjugados de la invención se pueden obtener acoplando un ácido nucleico amino-derivado a una forma derivada activada de un compuesto de estructura (I) o análogo del mismo. En una forma de realización particular, la forma del derivado activado es un derivado de un compuesto con la estructura (I) en donde R<sub>2</sub> es H, según la siguiente estructura (VII):



en donde

- n o m son números enteros que cada uno tiene un valor entre 0 y 6, inclusive;
- p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;
- q es un número entero que tiene un valor entre 0 y 20 inclusive;



5  $R_1$  es hidrógeno, alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado;  $-C(=O)R_A$ ;  $-CO_2R_A$ ;  $-C(=O)N(R_A)_2$  o  $-C(R_A)_3$ ; en donde cada suceso de  $R_A$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio;

10  $R_3$  es hidrógeno, halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado;  $-OR_C$ ;  $-C(=O)R_C$ ;  $-CO_2R_C$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_C$ ;  $-SOR_C$ ;  $SO_2R_C$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_C)_2$ ;  $-NHC(=O)R_C$ ;  $-NR_CC(=O)N(R_C)_2$ ;  $-OC(=O)OR_C$ ;  $-OC(=O)R_C$ ;  $-OC(=O)N(R_C)_2$ ;  $-NR_CC(=O)OR_C$  o  $-C(R_C)_3$ ; en donde cada suceso de  $R_C$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio;

15  $R_4$  es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado;

20  $R_5$  es hidrógeno, halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado;  $-OR_E$ ;  $-C(=O)R_E$ ;  $-CO_2R_E$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_E$ ;  $-SOR_E$ ;  $SO_2R_E$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_E)_2$ ;  $-NHC(=O)R_E$ ;  $-NR_EC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-OC(=O)OR_E$ ;  $-OC(=O)R_E$ ;  $-OC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-NR_EC(=O)OR_E$  o  $-C(R_E)_3$ ; en donde cada suceso de  $R_E$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio; y

25  $R_6$  es un radical activador de carbonilo.

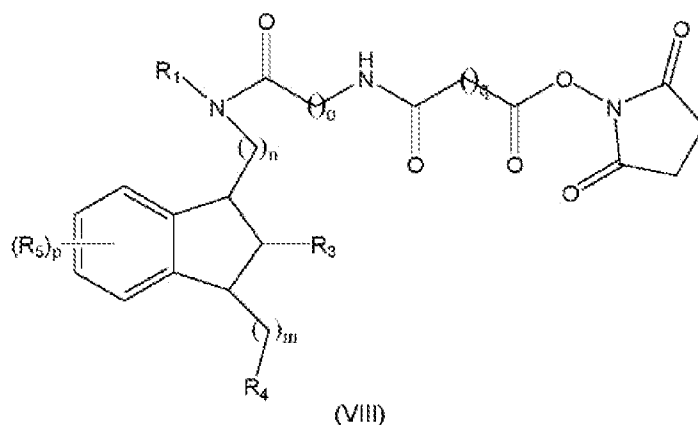
30 El término "radical activador de carbonilo" se refiere a un sustituyente de un carbonilo que hace ese carbonilo propenso a adición nucleofílica. En una forma de realización particular, forma, junto con el grupo carbonilo, un anhídrido, un haluro de ácido o un grupo éster. En una forma de realización preferida, el radical activador de carbonilo se selecciona de halógeno,  $-CO(O)R$ ,  $-OR'$ ,  $-SR''$ ; en donde  $R$ ,  $R'$  y  $R''$  se seleccionan independientemente de alquilo, haloalquilo, heterocíclico, arilo y heteroarilo de  $C_1-C_6$ .

35 El término "grupo activador de carbonilo" se refiere a un compuesto que convierte el carbonilo de un grupo ácido carboxílico a uno que es más propenso a la adición nucleofílica, tal como, por ejemplo, anhídridos, haluros de ácido carboxílico, carbodiimidas, agentes halogenantes, disulfuros, etc. En una forma de realización particular, el grupo activador de carbonilo se selecciona de agente halogenante,  $R(O)COC(O)R$ ,  $RC(O)halógeno$ ,  $R'OH$ ,  $R''SH$ ,  $R'''SSR''$ ; en donde  $R$ ,  $R'$  y  $R''$  se seleccionan independientemente de alquilo de  $C_1-C_6$ , haloalquilo, heterocíclico, arilo y heteroarilo.

40 En una forma de realización particular, el grupo activador de carbonilo es N-hidroxisuccinimida. En este caso, la reacción preferiblemente se realiza en presencia de un grupo activador de carbonilo adicional.

45 Los grupos activadores de carbonilo adecuados para este proceso incluyen carbodiimidas, tales como diciohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIC) y triazoles, tales como 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) y 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt). En una forma de realización preferida, el compuesto de fórmula (VII) se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida en presencia de diisopropilcarbodiimida para dar el derivado activado.

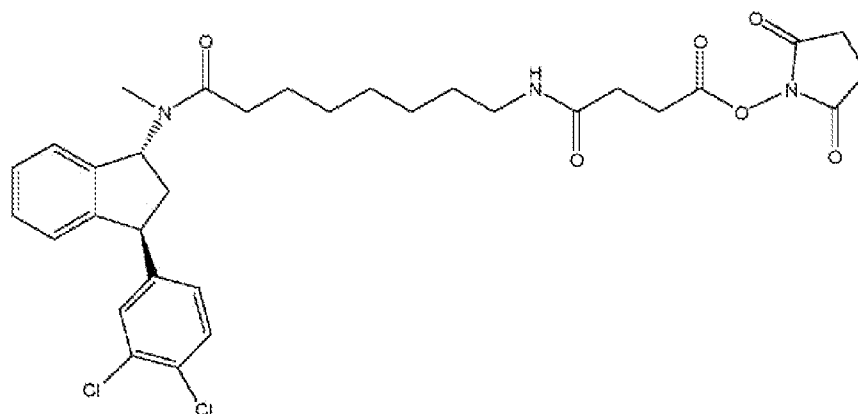
50 En una forma de realización particular,  $R^8$  es un grupo succinimidoxi. Por tanto, en otra forma de realización, los conjugados según la invención se pueden obtener acoplando un ácido nucleico amino-derivado a una forma derivada activada de sertralina o un análogo de la misma, en donde el derivado activado de un agente de selectividad es un compuesto de fórmula (VIII):



en donde  $R_1$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $n$ ,  $m$ ,  $p$  y  $q$  son como se han definido anteriormente.

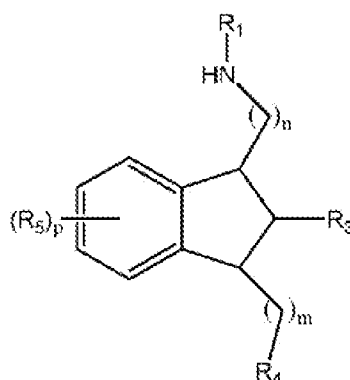
5

Según una forma de realización particular, el compuesto activado de fórmula (VIII) es el compuesto:



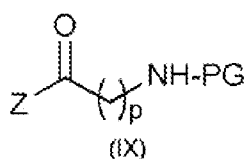
10 Según una forma de realización, los compuestos según la invención se pueden preparar mediante una secuencia que comprende:

a) hacer reaccionar un compuesto de fórmula (V):

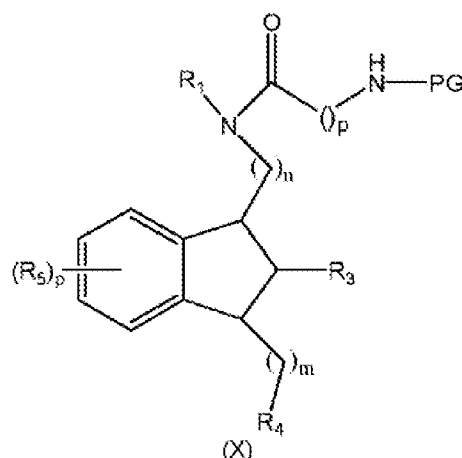


15

y un agente acilante de fórmula (IX):



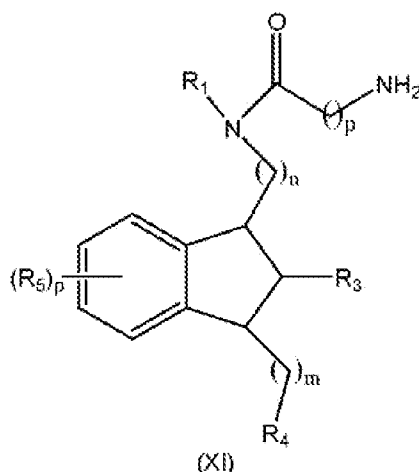
20 en donde  $p$  es como se ha definido anteriormente,  $Z$  es halógeno u OH y PG es un grupo protector amino para dar un compuesto de fórmula (X)



Los grupos protectores normalmente usados para aminas incluyen carbamatos, tales como carbamatos de tert-butilo, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 9H-fluorenilmetilo (Fmoc), alilo o nitrofenilo; amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometaonsulfonil amidas o tert-butilsulfonil amidas; y aril o arilalquilaminas, tales como p-metoxifenil, bencil, p-metoxibencil, 3,4-dimetoxibencil, dimetoxitritil o monometoxitritil aminas. En una forma de realización particular, el agente acilante de fórmula (IX) es el ácido 9H-fluorenilmetoxycarbonil-6-aminoheptanoico.

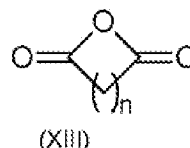
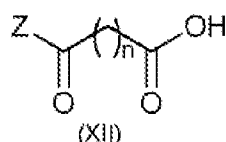
Los compuestos de fórmula (V) se pueden preparar a su vez, por ejemplo, como se describe en el documento US6455736. En particular, cuando el compuesto de fórmula (V) es sertralina, se puede obtener del clorhidrato correspondiente (comercialmente disponible) mediante tratamiento con una base adecuada, incluyendo bases orgánicas e inorgánicas tales como carbonatos o hidróxidos alcalinos o alcalinotérreos, amoníaco o aminas, tales como trimetilamina, trietilamina, diisopropiletilamina, piridina, piperidina, morfolina y similares.

b) desprotección del grupo amino protector en el compuesto de fórmula (V) para dar un compuesto de fórmula (XI):

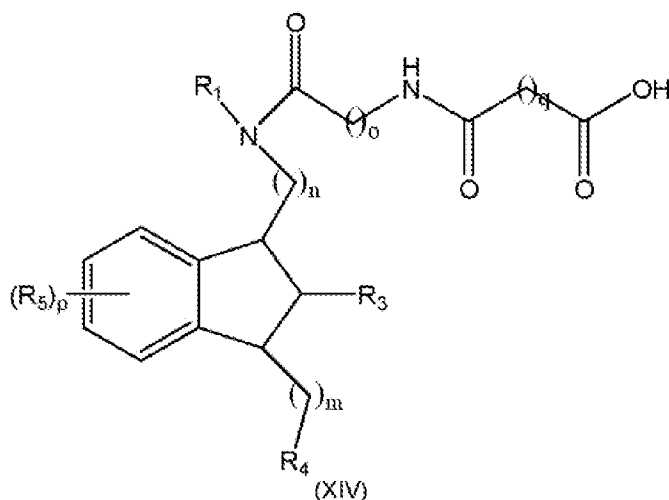


Las condiciones de desprotección las conoce el experto en la materia, por ejemplo, en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. and Greene T.W., 4ª Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3ª Ed. Georg Thieme Verlag). En una forma de realización particular, el grupo protector se elimina en presencia de una amina, tal como piperidina, morfolina, dicitclohexilamina, diisopropiletilamina o dimetilaminopiridina, preferiblemente en presencia de piperidina.

c) hacer reaccionar el compuesto de fórmula (XI) con un agente acilante de fórmula (XII) o (XIII):



en donde n es como se ha definido anteriormente y Z es halógeno u OH, lo que produce un compuesto de fórmula (XIV):



En una forma de realización particular, el agente acilante es anhídrido succínico,

d) tratar un compuesto de fórmula (XIV) con un grupo activador carbonilo.

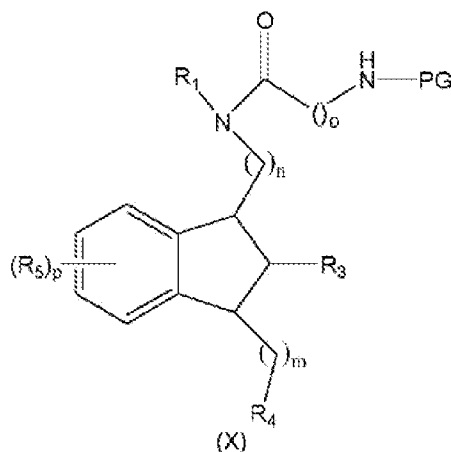
El término "grupo activador de carbonilo" se refiere a un compuesto que convierte el carbonilo de un grupo ácido carboxílico a uno que es más propenso a adición nucleofílica, tal como, por ejemplo, anhídridos, haluros de ácido carboxílico, carbodiimidas, agentes de halogenación, disulfuros, etc. En una forma de realización particular, el grupo activador de carbonilo se selecciona de agente de halogenación,  $R(O)COC(O)R$ ,  $RC(O)halógeno$ ,  $R'OH$ ,  $R''SH$ ,  $R''SSR''$ ; en donde R, R' y R'' se seleccionan independientemente de alquilo, haloalquilo, heterociclilo, arilo y heteroarilo de C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>.

En una forma de realización particular, el grupo activador de carbonilo es N-hidroxisuccinimida. En este caso, la reacción preferiblemente se realiza en presencia de un grupo activador de carbonilo adicional.

Por tanto, en una forma de realización particular, la etapa d) comprende tratar un compuesto de fórmula (XIV) con N-hidroxisuccinimida en presencia de un grupo activador de carbonilo adicional.

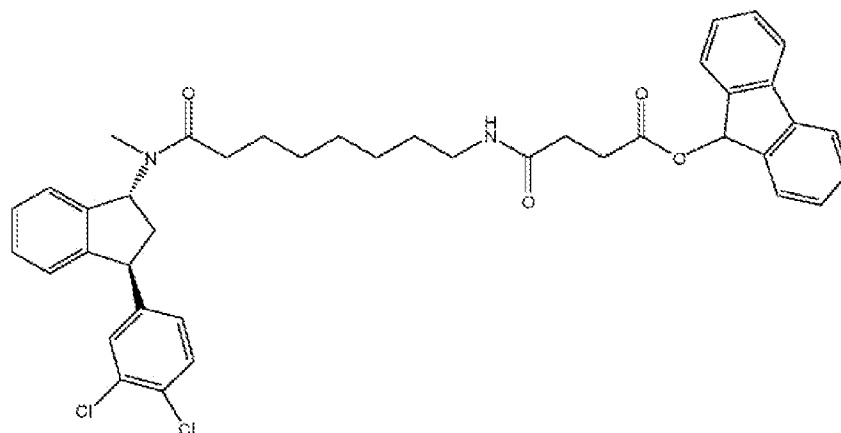
Los grupos activadores carbonilo adecuados para este proceso incluyen carbodiimidas, tales como dicitohexilcarbodiimida (DCC) y diisopropilcarbodiimida (DIC) y triazoles, tales como 1-hidroxi-benzotriazol (HOBT) y 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt). En una forma de realización preferida, el compuesto de fórmula (XIV) se hace reaccionar con N-hidroxisuccinimida en presencia de diisopropilcarbodiimida para dar el derivado activado.

Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (X),



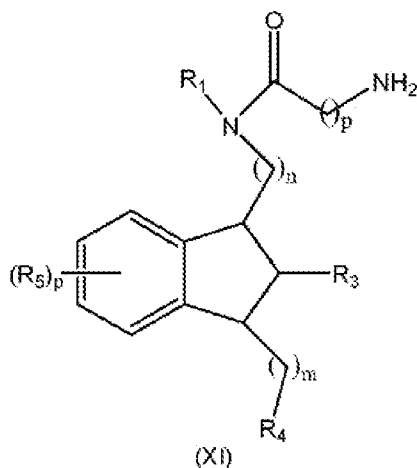
en donde R<sup>1</sup>-R<sup>5</sup>, m, n, o, p y PG son como se ha definido anteriormente.

En una forma de realización preferida,  $R^1$  es metilo,  $R^2$ - $R^5$  son hidrógeno, X e Y are cloruro, W es hidrógeno, p es 5 y PG es 9H-fluorenilmtoxycarbonilo. Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (X) es el compuesto:



5

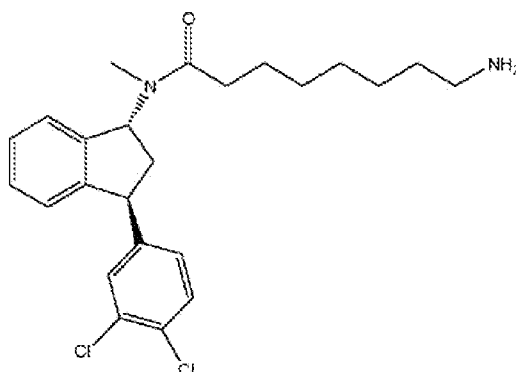
Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (XI),



10

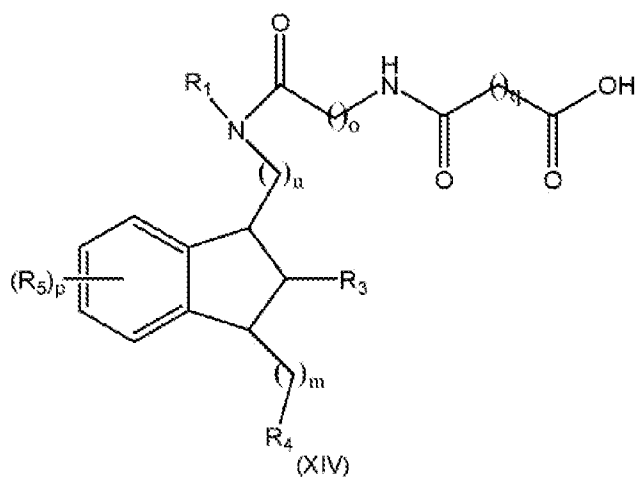
en donde  $R^1$ - $R^5$ , m, n, o y p son como se ha definido anteriormente.

Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (VII) es el compuesto:



15

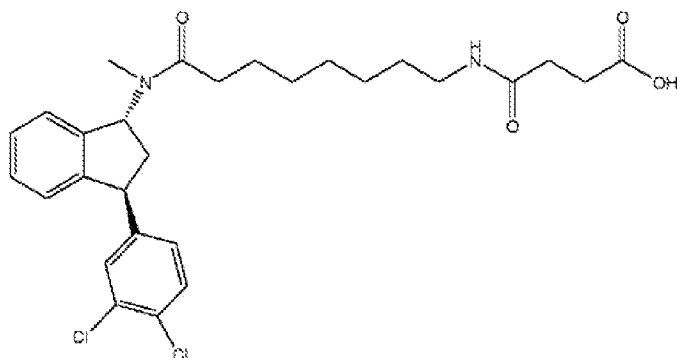
Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (XIV)



en donde  $R^1$ - $R^5$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$ ,  $p$  y  $q$  son como se ha definido anteriormente.

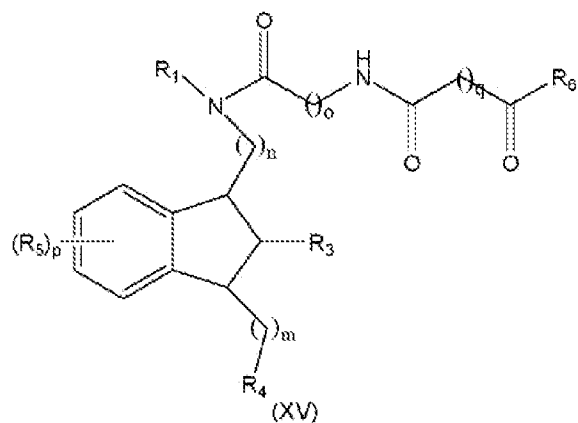
5

Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (VII) es:



10

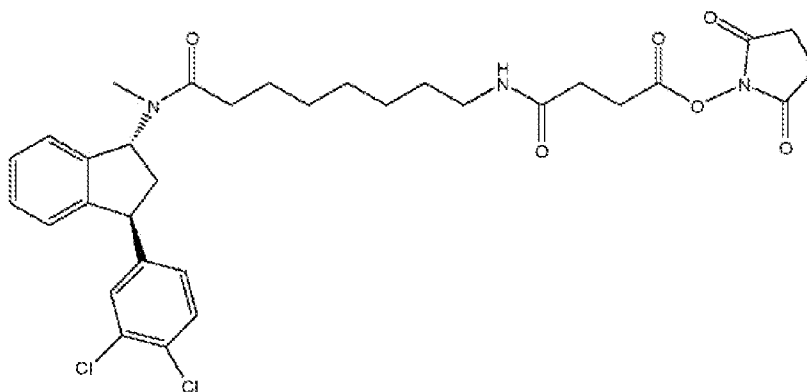
Según otro aspecto, la invención se dirige a un intermedio de fórmula (XV),



15

en donde  $R^1$ - $R^5$ ,  $m$ ,  $n$ ,  $o$  y  $n$  son como se ha definido anteriormente.

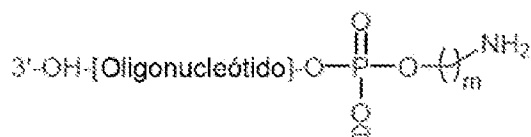
Más preferiblemente, el compuesto de fórmula (XV) es el compuesto:



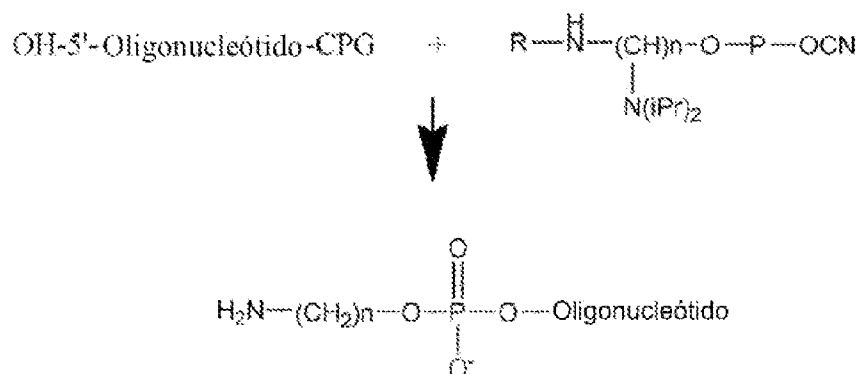
La hebra de ARNip que se va a unir al agente de selectividad se forma mediante síntesis de fase sólida por etapas en un soporte sólido siguiendo el método divulgado en "Oligonucleotide synthesis, a practical approach." editado por M.J. Gait. IRL Press-1985.

Para conjugar el agente de selectividad, el oligonucleótido necesita estar aminoderivado. Esto se puede hacer en el extremo 5' o en el 3'. En una forma de realización preferida el agente de selectividad se une al extremo 5'.

- Según una forma de realización de la síntesis, un conjugado según la invención se puede preparar haciendo reaccionar el agente de selectividad y un oligonucleótido amino-modificado de fórmula:



- El procedimiento general para activar un oligonucleótido usando un modificador amino enlazador será típicamente según el esquema siguiente:



- Después de acoplar el grupo 5'-OH del oligonucleótido al enlazador amino, el grupo protector de amino se elimina en condiciones conocidas. Por ejemplo, los derivados amino protegidos con TFA se pueden desproteger mediante tratamiento con amoníaco, mientras que los derivados amino protegidos con MMT se pueden desproteger mediante tratamiento con ácido acético, ácido cloroacético, ácido dicloroacético o ácido trifluoroacético.

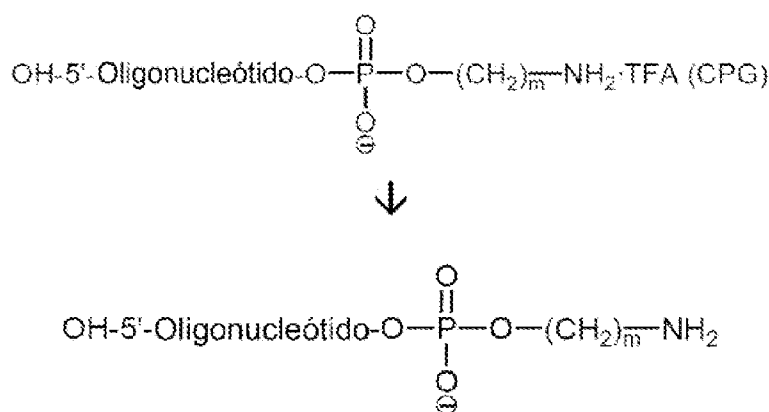
- Método general de síntesis del oligonucleótido aminomodificado:

- (i) preparar una solución de molécula de enlazador/modificador (secada al vacío) en acetonitrilo anhidrido (se usa una solución 0,1 M en la mayoría de las amiditas comercialmente disponibles) y colocarla en un depósito extra en el sintetizador (Y)
- (ii) al inicio de la síntesis de la secuencia de oligonucleótido requerida, añadir la base Y en el extremo 5'. Esto permitirá que la molécula de enlazador/modificador del depósito Y se acople al extremo de la secuencia del oligonucleótido
- (iii) iniciar la síntesis usando el ciclo de acoplamiento adecuado. El mismo ciclo de acoplamiento se usará para llevar a cabo el acoplamiento de la molécula de enlazador/modificador

- (iv) al final de la síntesis del oligonucleótido, lavar el soporte y por último secar el soporte con gas
- (v) eliminar el soporte sólido de la columna y transferirlo a un vial con tapa de rosca y completar la desprotección de 2 etapas.

El oligonucleótido aminomodificado se debe desproteger para la conjugación adicional con el agente de selectividad. Para este fin todos los grupos protectores restantes en el oligonucleótido se eliminan como sigue. Se añadieron 500 µl de una mezcla que contiene el 20% v/v de metilamina (solución acuosa al 40%) y el 80% v/v de una solución saturada de amoníaco (que contiene el 30-32% peso/volumen de NH<sub>3</sub>) a un tubo Eppendorf con el oligonucleótido (escala 200 nmoles). El tubo se cerró herméticamente y se calentó durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Este procedimiento elimina los grupos protectores en el átomo de fósforo de los nucleótidos (acetilación o benzoilación de la furanosa y la 2-cianometilación de los enlaces fosfodiéster) y los grupos protectores de los grupos amino exocíclicos (Bz, Ac, tBu). La mezcla se enfrió después y se filtró y el sobrenadante se secó. El precipitado residual se hizo reaccionar con trietilamina-HF 1 M durante 3 horas a 65°C para cortar los grupos protectores en 2' de los nucleótidos (2'-t-butil dimetil sililo-TBDMS). Por último, la solución resultante se desaló en una columna de Sephadex, dejando un oligonucleótido 5'-aminomodificado.

En el caso de incorporación del enlazador modificador amino en el extremo 3', se debe usar el soporte polimérico correspondiente (bolas de CPG) y el esquema de síntesis corresponderá al siguiente diagrama:



(la hidrólisis se puede hacer usando hidróxido de amonio o reactivo de Beckman) (metilamina: hidróxido de amonio).

En ambos casos, la etapa de desprotección será idéntica y el enfoque de conjugación en cada caso también es idéntico, pero con diferentes grados de eficacia. En la mayoría de los casos, se alcanzan mejores resultados con la derivación 5'-amino.

En una forma de realización particular, el oligonucleótido se hace reaccionar previamente con una fosforamida divalente o trivalente. De este modo se puede obtener un compuesto con dos o tres posiciones de acoplamiento, de modo que se pueden acoplar al oligonucleótido dos o tres moléculas de agente de selectividad. Dichas dos o tres moléculas de agente de selectividad pueden ser similares o diferentes.

En una forma de realización particular se acoplan al oligonucleótido dos o tres moléculas del mismo agente de selectividad. En otra forma de realización, se acoplan al oligonucleótido dos o tres moléculas de agentes de selectividad diferentes.

En una forma de realización, el oligonucleótido se hace reaccionar con una fosforamidita bivalente o trivalente.

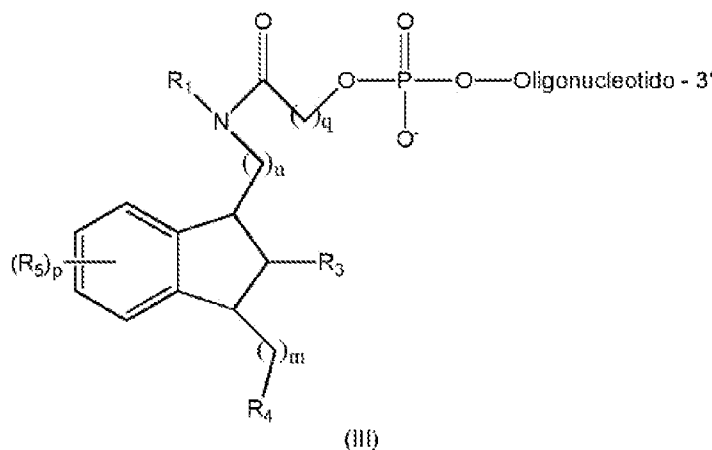
El experto en la materia conoce grupos protectores hidroxilo, así como las condiciones adecuadas de protección y desprotección, por ejemplo, en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. y Greene T.W., 4<sup>a</sup> Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3<sup>a</sup> Ed. Georg Thieme Verlag).

En una forma de realización particular, los grupos protectores hidroxilo se seleccionan de éteres, silil éteres, ésteres, sulfonatos, sulfenatos, sulfinatos, carbonatos y carbamatos. En una forma de realización preferida, los grupos protectores hidroxilo se seleccionan de acetilo, benzoilo, bencilo, metoxietoximetil éter (MEM), dimetoxitritilo (DMT), metoximetil éter (MOM), metoxitritilo (MMT), p-metoxibencil éter (PMB), metiltiometil éter, pivaloilo (Piv), tetrahidropirano (THP), Tritilo (Tr), 9H-fluorenilmetilo (Fmoc), trimetil sililo (TMS), tert-butildimetilsililo (TBDMS), tert-butildimetilsililoximetilo (TOM) y triisopropilsilil (TIPS) éter. Preferiblemente, PG, PG' y PG'' se seleccionan independientemente de H, DMT y Fmoc.

*Síntesis usando un ácido nucleico carboxi-derivado y un inhibidor triple de recaptación activado*



En una forma de realización preferida alternativa, el conjugado de la invención se obtiene por la conjugación de un agente de selectividad amino-derivado y un oligonucleótido carboxil-derivado. En particular, el conjugado de la invención tiene la estructura (III):



en donde

n o m son números enteros que cada uno tiene un valor entre 0 y 6, inclusive;

p es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;

q es un número entero que tiene un valor entre 0 y 20 inclusive;

R<sub>1</sub> es hidrógeno, alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; -C(=O)R<sub>A</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>A</sub>; -C(=O)N(R<sub>A</sub>)<sub>2</sub> o -C(R<sub>A</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada suceso de R<sub>A</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio;

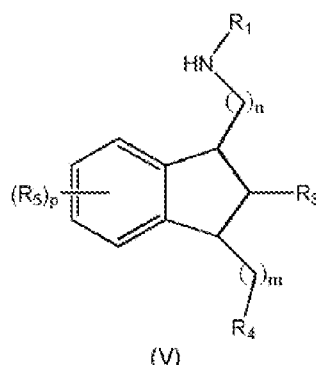
R<sub>3</sub> es hidrógeno, halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; -OR<sub>C</sub>; -C(=O)R<sub>C</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>C</sub>; -SOR<sub>C</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>C</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>C</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>C</sub>; -OC(=O)R<sub>C</sub>; -OC(=O)N(R<sub>C</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>C</sub>C(=O)OR<sub>C</sub>; o -C(R<sub>C</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada suceso de R<sub>C</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o fracción heteroariltio;

R<sub>4</sub> es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado;

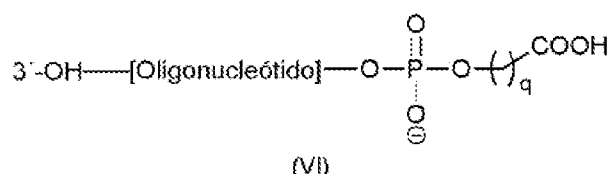
R<sub>5</sub> es hidrógeno, halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o no ramificado; -OR<sub>E</sub>; -C(=O)R<sub>E</sub>; -CO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -CN; -SCN; -SR<sub>E</sub>; -SOR<sub>E</sub>; SO<sub>2</sub>R<sub>E</sub>; -NO<sub>2</sub>; -N<sub>3</sub>; -N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NHC(=O)R<sub>E</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -OC(=O)OR<sub>E</sub>; -OC(=O)R<sub>E</sub>; -OC(=O)N(R<sub>E</sub>)<sub>2</sub>; -NR<sub>E</sub>C(=O)OR<sub>E</sub>; o -C(R<sub>E</sub>)<sub>3</sub>; en donde cada suceso de R<sub>E</sub> es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo, una fracción heteroarilo, alcoxi, ariloxi, alquiltio, ariltio, amino, alquilamino, dialquilamino, hetroariloxi o grupoheteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo;

y en donde el oligonucleótido es un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana en donde dicha molécula diana es alfa-sinucleína o el ARNm que codifica α-sinucleína.

El proceso de síntesis de un conjugado que tiene la estructura (III) comprende hacer reaccionar un compuesto que tiene la estructura (V):



con un oligonucleótido carboximodificado que tiene la fórmula (VI):



Por tanto, la invención también se refiere a un compuesto que tiene la estructura (VI) en donde el oligonucleótido es un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana en donde dicha molécula diana es alfa-sinucleína o el ARNm que codifica alfa-sinucleína. En una forma de realización particular, el oligonucleótido en el compuesto que tiene la estructura (VI) es un gapmero antisentido. En particular, dicho gapmero comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueados por bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

En una forma de realización particular, el oligonucleótido se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO:4), 499-516 (SEQ ID NO:5) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO:7). En una forma de realización preferida, el oligonucleótido en el compuesto que tiene la estructura VI consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

Grupos protectores comúnmente usados para aminas incluyen carbamatos, tales como carbamatos de tert-butilo, bencilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 9H-fluorenilmetilo (Fmoc), alilo o nitrofenilo; amidas, tales como formamidas, acetamidas, trifluoroacetamidas, sulfonamidas, trifluorometanosulfonil amidas o tert-butilsulfonil amidas; y aril o arilaquilaminas, tales como p-metoxifenil, bencil, p-metoxibencil, 3,4-dimetoxibencil, dimetoxitritil o monometoxitritil aminas. En una forma de realización particular, el agente acilante de fórmula (VII) es ácido 9H-fluorenilmetoxycarbonil-6-aminohexanoico.

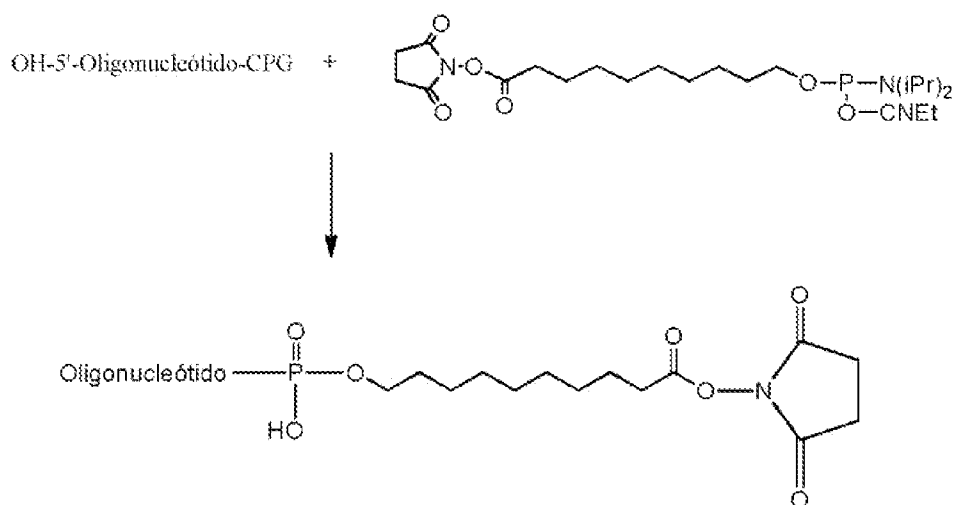
El experto en la materia conoce las condiciones adecuadas de desprotección, por ejemplo, en *Protecting Groups in Organic Synthesis* (Wuts, P.G.M. y Greene T.W., 4ª Ed. Wiley-Interscience) y en *Protecting Groups* (Kocienski P.J., 3ª Ed. Georg Thieme Verlag). En una forma de realización particular, el grupo protector se elimina en presencia de una amina, tal como piperidina, morfolina, diciohexilamina, diisopropiletilamina o dimetilaminopiridina, preferiblemente en presencia de piperidina.

La hebra de ARNip que se va a unir al agente de selectividad se forma mediante síntesis de fase sólida por etapas en un soporte sólido siguiendo el método divulgado en "Oligonucleotide synthesis, a practical approach," editado por M.J. Gait. IRL Press-1985.

Para conjugar el ligando de selectividad, el oligonucleótido necesita estar carboxiderivado. Esto se puede hacer en el extremo 5' o en el 3'. En una forma de realización preferida el ligando de selectividad se une al extremo 5'.

Según una forma de realización, los conjugados de fórmula (III) se pueden preparar haciendo reaccionar un compuesto de fórmula (V) como se ha descrito anteriormente y un oligonucleótido carboxi-modificado de fórmula (VI).

El procedimiento general para activar un oligonucleótido usando un enlazador carboxilo un modificador será típicamente según el esquema siguiente:



Método general de síntesis del oligonucleótido carboximodificado:

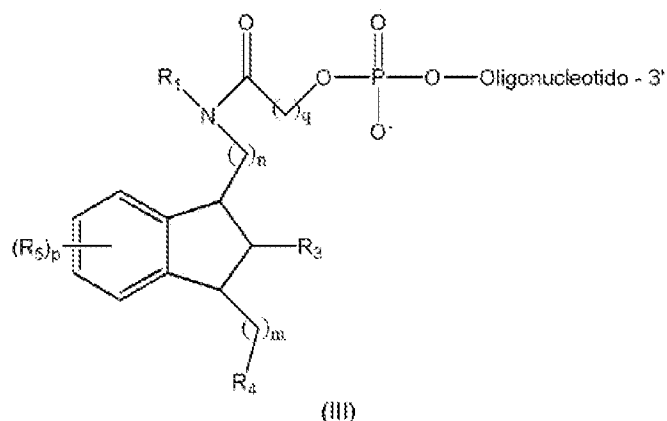
- 5 (i) preparar una solución de molécula modificador en acetonitrilo anhídrido y colocarla en un depósito extra en el sintetizador (Y)
- (ii) al inicio de la síntesis de la secuencia de oligonucleótido requerida, añadir la base Y en el extremo 5'. Esto permitirá que la molécula de enlazador/modificador del depósito Y se acople al extremo de la secuencia del oligonucleótido
- 10 (iii) iniciar la síntesis usando el ciclo de acoplamiento adecuado. El mismo ciclo de acoplamiento se usará para llevar a cabo el acoplamiento de la molécula de enlazador/modificador
- (iv) al final de la síntesis del oligonucleótido, lavar el soporte y por último secar el soporte con gas
- (v) eliminar el soporte sólido de la columna y transferirlo a un vial con tapa de rosca y completar la desprotección de 2 etapas.

15 El oligonucleótido carboximodificado se debe desproteger para la conjugación adicional con el agente de selectividad. Para este fin todos los grupos protectores restantes en el oligonucleótido se eliminan como sigue. Se añadieron 500 µl de una mezcla que contiene el 20% v/v de metilamina (solución acuosa al 40%) y el 80% v/v de una solución saturada de amoníaco (que contiene NH<sub>3</sub> del 30-32% peso/volumen) a un tubo Eppendorf con el oligonucleótido (escala 200 nmoles). El tubo se cerró herméticamente y se calentó durante 45 minutos a una temperatura de 65°C. Este procedimiento elimina los grupos protectores en el átomo de fósforo de los nucleótidos (acetilación o benzoilación de la furanosa y la 2-cianoetilación de los enlaces fosfodiéster) y los grupos protectores de los grupos amino exocíclicos (Bz, Ac, tBu). La mezcla se enfrió después y se filtró y el sobrenadante se secó. El precipitado residual se hizo reaccionar con trietilamina-HF 1 M durante 3 horas a 65°C para cortar los grupos protectores en 2' de los nucleótidos (2'-t-butil dimetil sililo-TBDMS). Por último, la solución resultante se desaló en una columna de Sephadex, dejando un oligonucleótido 5'-carboximodificado.

En una forma de realización particular, el oligonucleótido comprendido por el conjugado sintetizado por el método de la invención es un gapmero antisentido. En particular, el gapmero comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueados por bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

En una forma de realización preferida, el oligonucleótido comprendido por el conjugado sintetizado por el método de la invención se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO:4), 499-516 (SEQ ID NO:5) y 502-519 (SEQ ID NO:6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO:7). En particular, el ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

El oligonucleótido carboxil-activado se hace reaccionar después con el derivado activado de un agente de selectividad de fórmula (V) como se define anteriormente. Se obtiene un compuesto que tiene la fórmula general (III):



En particular, este compuesto (III) comprende un oligonucleótido que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana en donde dicha molécula diana es alfa-sinucleína o el ARNm de alfa-sinucleína. En una forma de realización particular, el oligonucleótido en el compuesto que tiene la estructura (III) es un gapmero antisentido. En particular, dicho gapmero comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueado por bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

En una forma de realización particular, el oligonucleótido comprendido por el conjugado sintetizado por el método de la invención se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 448-465 (SEQ ID NO:4), 499-516 (SEQ ID NO:5) y 502-519 (SEQ ID NO:6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO:7). En una forma de realización preferida, el oligonucleótido en el compuesto que tiene la estructura (III) consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3.

\*\*\*

Se proporcionan los siguientes ejemplos y figuras a modo de ilustración y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

## Ejemplos

### EJEMPLO 1. Validación de direccionamiento: función

#### Diseño experimental

Para determinar funcionalmente el direccionamiento de las moléculas según la invención, se usó un conjugado que comprende una molécula antisentido dirigida al receptor de 5HT1A acoplada a indatralina. Indatralina es un inhibidor no selectivo del transportador de monoaminas que bloquea la recaptación de dopamina, norepinefrina y serotonina. La molécula se administró por vía intranasal para validar que la indatralina se dirige a los núcleos del rafe. Se probaron dos concentraciones diferentes (30 y 100  $\mu\text{g}/\text{ratón}$ ) y se evaluó la hipotermia después de la administración de 8-OH-DPAT para determinar funcionalmente que los receptores de 5-HT1A en el rafe eran dianas. La temperatura basal se determinó 24 horas después de la administración intranasal de la molécula.

8-hidroxi-2-(di-n-propilamino)tetralina (8-OH-DPAT) es un agonista selectivo de 5-HT1A que induce hipotermia en ratones activando los autorreceptores somatodendríticos de 5-HT1A en el rafe mediano. Mediante este ensayo, se determina si la hipotermia inducida por 8-OH-DPAT se puede bloquear por indatralina, si es capaz de dirigirse al rafe, y el antisentido específico de 5-HT1A.

Se administraron 30 y 100  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de la molécula según la invención por vía intranasal y 24 después se midió la temperatura basal. Se administró 8-OH-DPAT 1 mg/kg por vía intraperitoneal (i.p.) y se midió la temperatura 5, 15, 30, 60 y 120 minutos después de ello.

#### Resultados

Se observó que los oligos dirigidos con indatralina son capaces de alcanzar el rafe por vía intranasal y atenuar la expresión de 5-HT1A 24 horas después de la administración en una única aplicación (véase la figura 1). Ambas concentraciones pudieron bloquear el cambio de temperatura producido por 8-OH-DPAT en una única dosis, pero se eligió 30  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  en los siguientes experimentos debido a la administración estándar de 4 días, lo que permite una acumulación del oligo a lo largo del tiempo.

EJEMPLO 2. Validación de direccionamiento: localización*Diseño experimental*

- 5 Para visualizar si la sustancia negra, locus cerúleo y el rafe eran dianas, se usó una administración intraventricular de indatralina-antisentido marcada con el fluoróforo Alexa488.

La expresión del transportador de dopamina (DAT) se localiza en neuronas dopaminérgicas de la pars compacta de la sustancia negra (SNc)

- 10 La expresión del transportador de norepinefrina (NET, también conocido como familia de transportador de soluto 6 miembro 2, SLC6A2) está restringida a las neuronas noradrenérgicas en el locus cerúleo (LC) y no está presente en neuronas que liberan dopamina o epinefrina.

- 15 La expresión del transportador de serotonina (SERT) se localiza principalmente en neuronas serotoninérgicas localizadas en los núcleos del rafe con altos niveles en el rafe dorsal (DR).

- 20 Para fines de colocación se seleccionaron tirosina hidroxilasa (TH) y triptófano hidroxilasa (TPH). TH cataliza la etapa limitante de velocidad en la síntesis de catecolaminas y se expresa mucho en SN y LC. TPH está implicada en la síntesis de serotonina y se expresa en el rafe.

*Resultados*

- 25 Se tomaron imágenes confocales en un único plano de las tres áreas de interés (SN, LC y DR). Se realizó la fluorescencia directa de indatralina-oligo-Alexa488 en verde, coteñida con anti-TH (tirosina hidroxilasa) para LC y SN, anti-TPH (triptófano hidroxilasa) para DR y DAPI para la tinción nuclear. Los animales se sacrificaron 1 hora y 24 horas después de la cirugía, y se observó una tinción clara del oligo a 1 hora. No se detectó fluorescencia de Alexa488 en otras regiones cerebrales.

- 30 Las imágenes confocales en un único plano de las tres áreas de interés a más aumentos mostraron que la tinción citoplásmica e intranuclear de la molécula que colocaliza en neuronas TH (SN y LC) y TPH (DR) era positiva.

- 35 Por tanto, se observó un direccionamiento específico de la molécula 1 hora después de la administración solo en las áreas dadas: SN, LC y DR en animales con administración intraventricular de oligos conjugados con indatralina, lo que proporciona evidencia que los oligos dirigidos alcanzaron las áreas dadas y se internalizaron en neuronas, alcanzando el citoplasma y el núcleo.

EJEMPLO 3. Selección de candidatos*Diseño experimental*

- 40 Se seleccionaron un total de 7 moléculas precandidatas mediante ensayo de RNasa H. El objetivo de este ensayo era determinar cuál de los siete oligonucleótidos fomenta la actividad de esta endonucleasa no específica que cataliza el corte del ARNm.

- 45 Para determinar la atenuación del ARNm *in vivo*, se realizó hibridación *in situ* en un total de cinco animales por molécula analizada. Las siete moléculas precandidatas se dividieron en dos grupos administrados en semanas consecutivas. Se administraron un total de 30 µg/ratón/día durante 4 días consecutivos. Los animales se sacrificaron 24 horas después de la última administración.

- 50 Se analizaron los niveles de proteína de alfa-sinucleína en la sustancia negra (SNc/VTA) y el cuerpo estriado por inmunotransferencia. Los ratones se trataron 4 días consecutivos por vía intranasal con 1 mg/kg/día de PD-1233 y secuencia sin sentido con el mismo ligando que PD-1233. Los animales se sacrificaron 24 h, 3 días y 7 días después de la última administración.

*Resultados*

La figura 2 muestra los resultados del ensayo de RNasa H.

- 60 Se usaron los siguientes criterios durante la selección: candidatos seleccionados como se muestra en la figura 2, una homología del 94-100% entre 5 especies (ratón, rata, perro, mono y ser humano), sin homología con otras sinucleínas (gamma y beta) e induce la actividad RNasa H.

- 65 Para realizar los estudios *in vivo*, la química final para el oligonucleótido se seleccionó como se describe en el esquema mostrado en la figura 3.

Las características de los precandidatos del grupo I se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Precandidatos del grupo I

ID#	Nº	Gen diana	Especie	Secuencia anti-sentido (5'3')	SEQ ID NO
1232	18	SNCA	Todas	cuccAACATTGTGTCacuu	1
1233	18	SNCA	Todas	cuccCTCCACTGTCuucu	2
1234	18	SNCA	Todas	cugcTCCCTCCACTgucu	3

Los datos de hibridación *in situ* mostraron niveles reducidos de  $\alpha$ -sin en la sustancia negra lo que indica la atenuación eficaz de  $\alpha$ -sin por el candidato 1234 comparado con vehículo, así como niveles reducidos de  $\alpha$ -sin en el rafe dorsal por los candidatos 1233 y 124.

La figura 4 muestra la cuantificación de los niveles de ARNm de  $\alpha$ -sinucleína ( $\alpha$ -sin), calculado como porcentaje de vehículo, en bulbos olfativos (BO), sustancia negra (SNc/MTA), rafe dorsal (DR) y rafe mediano (MnR).  $\pi$   $p < 0,05$  frente a sin sentido (IDN-ss-ASO), \*  $p < 0,05$  frente a vehículo, \*\*  $p < 0,01$  frente a vehículo (ANOVA bidireccional).

Se observó que los candidatos 1232, 1233 y 1234 pudieron disminuir los niveles de ARNm de  $\alpha$ -sinucleína en las áreas diana a una dosis de 30  $\mu$ g/ratón/día durante 4 días consecutivos sin afectar los niveles en otras áreas del cerebro. La mayor disminución se observó en SN (sustancia negra) con el precandidato 1234 y el rafe con el precandidato 1233. No estuvieron afectadas otras áreas cerebrales.

La figura 8 muestra los niveles en la sustancia negra SNc/MTA de alfa-sinucleína normalizados frente a beta-actina y tirosina hidroxilasa (TH), así como los niveles de TH normalizados frente a beta-actina. 1233 produjo una disminución significativa en los niveles de alfa-sinucleína ( $p < 0,05$ ) 24 h después de la última administración, y los niveles se recuperaron 3 días después.

La figura 9 muestra los niveles en el cuerpo estriado de alfa-sinucleína normalizados frente a beta-actina y tirosina hidroxilasa (TH), así como los niveles de TH normalizados frente a beta-actina. 1233 produjo una disminución significativa en los niveles de alfa-sinucleína ( $p < 0,05$ ) 24 h después de la última administración, y los niveles se recuperaron 3 días después.

#### EJEMPLO 4. Toxicidad

##### Diseño experimental

También se analizó si las moléculas previamente ensayadas podían inducir la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TNF $\alpha$  en CMSP humanas (células mononucleares de sangre periférica). Los compuestos se probaron como diluciones de 6 puntos semilogarítmicas (concentraciones 10, 3,16, 1,0, 0,32, 0,1 y 0,03  $\mu$ M). Se probó el efecto de los compuestos en CMSP en triplicado con una placa de citotoxicidad alamarBlue corrida en paralelo.

##### Resultados

La tabla 2 muestra que ninguna de las moléculas pudo inducir una respuesta inmune en CMSP.

Tabla 2. Respuesta inmune a las moléculas en análisis

CE50 ( $\mu$ M) de inducción de 6 puntos								
	IFN $\alpha$	IL-10	IL-12p40	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	INF $\gamma$	TNF $\alpha$
1232	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1233	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
1234	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
EMax (pg/mL) de inducción de 6 puntos								
	IFN $\alpha$	IL-10	IL-12p40	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	INF $\gamma$	TNF $\alpha$
1232	6,9	2,4	2,4	3,1	3,8	36	12	3,1
1233	12	2,4	2,4	2,5	3,6	28	12	3,5
1234	11	2,4	2,9	7,9	5,4	27	12	3,7
	IFN $\alpha$	IL-10	IL-12p40	IL-1 $\beta$	IL-2	IL-6	INF $\gamma$	TNF $\alpha$
Ctrl. sin estim. 1	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	55	12	3,6
Ctrl. sin estim. 2	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5	48	12	3,1
Comp. Ref.	2,4	38	21	170	590	95	24	1100

Ctrl. sin estim. 1: Control sin estimular 1; Ctrl. sin estim. 2: Control sin estimular 2. Comp. Ref.: compuesto de referencia.

#### EJEMPLO 5. Selección adicional de candidatos

*Diseño experimental*

La selección final se realizó evaluando la complementariedad de las secuencias candidatas con varias especies, incluyendo la humana. Las especies consideradas para la caracterización adicional fueron, ratón, mono y ser humano. Se realizó un análisis BLAST usando bases de datos genómicas y transcriptómicas para seres humanos y ratón, y usando la base de datos ref.seq.RNA para mono.

*Resultados*

Se observó que los tres precandidatos eran 100% homólogos a la  $\alpha$ -sinucleína humana y de mono.

En particular, la molécula precandidata 1234 tenía un mal emparejamiento en el nt2 para la secuencia de  $\alpha$ -sinucleína de ratón, pero esto no afectó su actividad. Las moléculas precandidatas 1232 y 1233 no tenían homología con ningún otro gen humano. El precandidato 1234 tenía alguna homología con 2 genes más. Se requirió especial atención para los putativos efectos inespecíficos sobre sintafilina. Este gen se expresa mucho en el cerebro y también en la SN en seres humanos.

La figura 5 muestra el análisis de sustancia negra medial y lateral (SNs) de muestras de cerebro post mortem obtenidas de individuos con enfermedad de Parkinson esporádica (EP). La SN muestra daño tisular extenso en EP.

La figura 6 muestra el alineamiento de la secuencia de sintafilina para las tres especies (los 15 nt del candidato 1234 comunes al ARNm de  $\alpha$ -sinucleína en seres humanos se muestra en una caja). Este alineamiento mostró que no hay homología con la secuencia de ratón, y que hay un mal emparejamiento interno en la secuencia de mono en el nt10, disminuyendo probablemente la actividad RNasa H en mono.

Considerando todos estos datos, los inventores de la presente invención seleccionaron la molécula #1233 (de ahora en adelante, también designada NLF-PD-1233 o PD-1233) como el mejor candidato, con la secuencia: cuccCTCCACTGTCuucu, como se muestra en la figura 7.

**EJEMPLO 6: Farmacodinámica secundaria. Potencial inducción de citoquinas por NLF-PD-1233***Diseño experimental*

Se usaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas para investigar el potencial de NLF-PD-1233 (1233) para inducir la secreción de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ .

NLF-PD-1233 se probó a concentraciones de 0,03, 0,1, 0,3, 1, 3 y 10  $\mu$ M. La secreción de citoquinas se determinó usando kits Luminex multiplex. Se usó concanavalina A (30 mg/ml) como compuesto de referencia de proliferación.

*Resultados*

NLF-PD-1233 hasta concentraciones de 10  $\mu$ M no indujo la liberación de IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, IFN $\gamma$  o TNF $\alpha$  de CMSP humanas.

**EJEMPLO 7: Farmacología de seguridad. Efectos potenciales de NLF-PD-1233 sobre el sistema nervioso central (SNC)***Diseño experimental*

Se evaluaron los efectos potenciales de NLF-PD-1233 sobre el SNC en una Bateria Observacional Funcional (BOF) en ratones (prueba de Irwin) (no-GLP).

Grupos de seis ratones CD-1 machos recibieron dosis únicas de 0,3, 1,0 o 3,0 mg/kg de NLF-PD-1233 o vehículo por vía intranasal en un volumen total de 20  $\mu$ l/animal administrando 10  $\mu$ l a cada narina usando una pipeta calibrada.

Los animales se observaron para comportamiento general, efectos autonómicos y motores basados en el método de Irwin (Irwin S 1968 Psychopharmacologia (Berl.) 13: 222-257). También se midió la temperatura del cuerpo.

Las observaciones se realizaron a los 30, 60, 120, 240 y 360 minutos después de la dosis. Además, se midió la temperatura rectal de cada animal pre-dosis e inmediatamente después de cada observación. Los animales se mantuvieron durante 7 días más después del día de la dosis, tiempo durante el cual se observaron para signos macroscópicos de toxicidad y mortalidad.

*Resultados*

La administración intranasal de NLF-PD-1233 a niveles de dosis de 0,3, 1 y 3 mg/kg no produjo cambios de comportamiento, fisiológicos o de temperatura corporal notables en ratones macho cuando se comparan con el grupo control de vehículo.

Por tanto, se consideró que el NOEL (nivel de efecto no observado) era >3 mg/kg.

*EJEMPLO 8: Farmacocinética**Diseño experimental*

Ensayo de hibridación: se desarrolló un ensayo de hibridación competitivo usando una sonda de ácido peptidónucleico (APN) marcado con fluorescencia para detectar NLF-PD-1233.

HPLC con detección de fluorescencia: Se usó un método de HPLC de intercambio aniónico (AEX) con detección de fluorescencia para detectar NLF-PD-1233 en sangre y tejidos a través de hibridación con la sonda de APN marcada con fluorescencia (5'-Atto425-OO-GAAGACAGTGGAGGGA-3', SEQ ID NO:19) antes de la inyección en el HPLC. Como el ODN en NLF-PD-1233 es ADN sin modificar que se sabe que es inestable en plasma, el ODN se modificó introduciendo una dT invertida en el extremo 3' de la secuencia. Se mostró que el límite inferior de cuantificación (LLOQ) para NLF-PD-1233 era 0,6 ng/ml en plasma y 1,5 ng/g en tejidos.

*Resultados**Determinación de concentraciones en plasma después de la administración intravenosa de NLF-PD-1233 a ratones*

Se administraron NLF-PD-1233 sin modificar y el derivado 3' protegido por vía intravenosa a ratones. Se determinaron las concentraciones en plasma por un ensayo de hibridación.

Las concentraciones en plasma de NLF-PD-1233 sin modificar eran detectables durante 1 hora después de la administración intravenosa a ratones (véase la figura 10). El NLF-PD-1233 3' protegido era detectable en la circulación de ratones durante al menos 24 horas después de la administración intravenosa.

Estos datos indican que NLF-PD-1233 sin modificar, en contraste al derivado 3' protegido, se degrada rápidamente en la sangre por nucleasas.

*Determinación de concentraciones en plasma después de la administración intravenosa de NLF-PD-1233 a macacos cangrejeros*

Se administró NLF-PD-1233 por vía intravenosa a 0,3 y 1 mg/kg, a monos y se determinaron las concentraciones en sangre por ensayo de hibridación.

Se observa un rápido descenso de la concentración de NLF-PD-1233 y una hora después de la dosis no era detectable compuesto parental (véase la figura 11). Se detectaron varios picos de metabolitos, cuyo patrón era típico de una digestión 3'-exonucleolítica.

*Determinación de concentraciones en LCR después de la administración intranasal de NLF-PD-1233 a macacos cangrejeros*

Se administró NLF-PD-1233 por vía intranasal con una dosis única a 0,3 y 3 mg/kg y diaria durante 14 días a 1 mg/kg. Se determinaron las concentraciones en LCR y sangre por ensayo de hibridación.

Las concentraciones de NLF-PD-1233 en LCR (figura 12A) y sangre (figura 12B) eran dependientes de la dosis, pero no proporcionales a la dosis. La C<sub>max</sub> en LCR (líquido cefalorraquídeo) era aproximadamente 100 pg/ml (0,3 mg/kg) y 400 pg/ml (3 mg/kg), mientras que la C<sub>max</sub> en sangre era aproximadamente 60 pg/ml (0,3 mg/kg) y aproximadamente 3800 pg/ml (3 mg/kg). El aumento en la concentración de NLF-PD-1233 en sangre era más intenso que el aumento en LCR (véase la figura 12).

Después de dosis intranasales múltiples de 1 mg/kg durante 14 días ya se observó una concentración baja en las muestras predosis de LCR. La C<sub>max</sub> en LCR era aproximadamente 400 pg/ml. Esta C<sub>max</sub> era comparable a la administración única de 3 mg/kg, que se puede explicar por un efecto de acumulación durante la fase de dosis múltiples, con la menor concentración de aun aproximadamente 150 pg/ml a las 48 horas después de la dosis. En sangre, la C<sub>max</sub> era aproximadamente 300 pg/ml, pero no se observó efecto de acumulación (figura 12).



## Distribución

La distribución tisular de NLF-PD-1233 después de una única dosis intranasal de 1 mg/kg se determinó en ratones (3 animales por tiempo).

- 5 Se recogieron muestras de cerebro, hígado, riñón, bazo, pulmón, estómago y plasma 15 minutos, 1, 6 y 24 horas tras la dosis.

Se determinaron las concentraciones en plasma y tejidos de NLF-PD-1233 usando AEX-HPLC con detección de fluorescencia.

- 10 Las mayores concentraciones de NLF-1233 se encontraron en el estómago 1 y 6 horas tras la dosis, pero con alta variabilidad entre animales individuales (tabla 3).

- 15 24 horas tras la dosis, la concentración en todos los tejidos que se analizaron estaba por debajo o próximas al límite de detección del ensayo. Solo en estómago y en hígado (un animal solo) eran detectables cantidades significativas de NLF-PD-1233 (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones medias en cerebro, hígado, riñón, bazo, pulmón, estómago ( $\pm$ DE) de NLF-PD-1233 después de la administración nasal a ratones.

Tiempo [h]	Hígado [ng/g]	Riñón [ng/g]	Bazo [ng/g]	Cerebro [ng/g]	Pulmón [ng/g]	Estómago [ng/g]
0,25	0,6 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,5	166,9 $\pm$ 235,8	BDL DE n.a	1,4 $\pm$ 1,6	3070,1 $\pm$ 1696,7
1	3,9 $\pm$ 4,6	1,0 $\pm$ 1,1	3,8 $\pm$ 2,5	0,7 $\pm$ 0,5	23,3 $\pm$ 30,9	110490 $\pm$ 159331
6	0,4 $\pm$ 0,4	0,3 $\pm$ 0,2	2,1 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,4	2,5 $\pm$ 3,5	119262 $\pm$ 196183
24	7,1 $\pm$ 12,1	BDL DE n.a	0,1 DE n.a.	0,4 DE n.a.	BDL DE n.a.	33,5 $\pm$ 9,9

- 20 El valor atípico no se eliminó del cálculo. Si la desviación estándar (DE) se ajusta a no aplicable (n.a.), el valor no se pudo calcular debido al bajo número de valores por encima del límite de detección.

- 25 Se observaron metabolitos de NLF-PD-1233 en todas las muestras de tejidos donde la concentración del compuesto parental era alta. Se puede asumir que en tejidos con baja concentración del compuesto parental, los metabolitos también estaban presentes, pero por debajo del límite de detección. El patrón de picos observado indicaba que la degradación de NLF-1233 está inducida principalmente por 3'-exonucleasas.

- 30 No se observó exposición de plasma significativa a NLF-PD-1233, con excepción de un animal en el tiempo de 15 minutos.

- 35 NLF-PD-1233 se detectó en cerebro a una concentración de aproximadamente 1 ng/g a 1 y 6 horas tras la dosis. Como el tejido cerebral estaba completamente homogenizado no se pudo sacar ninguna conclusión de la distribución espacial.

Se encontró que la variabilidad global de animal a animal después de la administración intranasal era muy alta.

- 40 Se determinó la distribución tisular de NLF-PD-1233 sin modificar y del derivado 3' protegido en ratones (3 animales por tiempo) después de una dosis intravenosa única de 1 mg/kg. Se recogieron muestras de cerebro, hígado, bazo, riñones y plasma y se analizaron 15 minutos, 1, 6 y 24 horas tras la dosis.

- 45 Se midieron concentraciones tisulares bajas del compuesto parental NLF-PD-1233 sin modificar 15 minutos después de la dosis intravenosa de ratones. Las mayores concentraciones de NLF-PD-1233 sin modificar se encontraron en el hígado. NLF-PD-1233 también estaba presente en el cerebro a concentraciones bajas (figura 13).

Las concentraciones tisulares de NLF-PD-1233 sin modificar más metabolitos eran ligeramente más altas que para el compuesto parental solo con las mayores concentraciones medidas en el hígado y los riñones (figura 14).

- 50 Las concentraciones tisulares de NLF-PD-1233 3' modificado eran más altas que para NLF-PD-1233 sin modificar lo que demuestra que la estabilización frente a 3' exonucleasa disminuye la degradación del compuesto parental (figura 15).

Las concentraciones tisulares del derivado 3' protegido de NLF-PD-1233 más metabolitos eran solo ligeramente más altas comparadas con el compuesto parental solo (figura 16).

- 55 EJEMPLO 9. Ensayos funcionales

Con el fin de determinar si los conjugados según la invención son capaces de aumentar la liberación de dopamina en el sistema nervioso central, se midió el nivel de dopamina en respuesta a veratridina (activador de canales de sodio) o el nivel de dopamina extracelular en respuesta a nomifensina (inhibidor de la recaptación de dopamina) en ratones tratados con el conjugado 1233 o en ratones control.

#### *Diseño experimental*

Se realizó un ensayo de microdiálisis *in vivo*. Los animales se trataron con vehículo (PBS) o 1233 (4 días consecutivos, 1 mg/kg/día). Se midieron la liberación de dopamina provocada por veratridina y la dopamina extracelular por HPLC.

#### *Resultados*

El ensayo de microdiálisis *in vivo* de liberación de dopamina provocada por veratridina medida por HPLC en animales tratados con vehículo (PBS) o 1233 mostró un aumento significativo en la liberación de dopamina después de una exposición farmacológica después de disminuir los niveles de  $\alpha$ -sinucleína por tratamiento con NLF-PD-1233 (véase la figura 17).

El ensayo de microdiálisis *in vivo* de la dopamina extracelular medida por HPLC en animales tratados con vehículo (PBS) o 1233 mostró un aumento significativo en liberación después de una exposición farmacológica (nomifensina, un inhibidor de la recaptación de norepinefrina-dopamina), y un aumento significativo en los niveles de dopamina después del tratamiento con NLF-PD-1233 (véase la figura 18).

#### **Lista de secuencias**

<110> NLIFE THERAPEUTICS, S.L.

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN SELECTIVA DE MOLÉCULAS DE OLIGONUCLEÓTIDOS A TIPOS ESPECÍFICOS DE NEURONAS

<130> P8848UPEP

<150> EP12382414.6

<151> 26-10-2012

<150> US61/719284

<151> 26-10-2012

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gapmero dirigido a la región en las posiciones 448-465 del ARNm de la alfa-sinucleína

<400> 1

cuccaaccatt tggtaacuu

18

<210> 2

<211> 18

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Gapmero dirigido a la región en las posiciones 499-516 del ARNm de la alfa-sinucleína

<400> 2

	cuccctccac tgtcaucn	18
	<210> 3	
	<211> 18	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Gapmero dirigido a la región en las posiciones 502-519 del ARNm de la alfa-sinucleína	
10	<400> 3	
	cugctccctc cactgucn	18
	<210> 4	
15	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 4	
20	aagtgcacaa tgttggag	18
	<210> 5	
	<211> 18	
	<212> ADN	
25	<213> Homo sapiens	
	<400> 5	
	agaagacagt ggagggag	18
30	<210> 6	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
35	<400> 6	
	agacagtgga yggagcag	18
	<210> 7	
	<211> 3215	
40	<212> ADN	
	<213> Homo sapiens	
	<400> 7	

aggagaagga gaaggaggag gactaggagg aggaggacgg cgacgaccag aagggygcca	60
agagaggggg ogagcgaccg agcgccggga cggggaagtg aggtgctggo gggctgcagc	120
gcagaccccg gcccgggccc tcgagagagc tcctgggggc tccctcagcg cttgccttca	180
agccttctgc ctttcacccc tcgtgagcgg agaactggga gtggccattc gacgacagtg	240
tgggtgtaaag gaattcatta gccatggatg tttcatgaa aggactttca aaggccaagg	300
agggagttgt ggcgtctgct gagaaaacca aacagggtgt ggcagaagca gcaggaaaga	360
caaaagaggg tgttctctat gtaggctcca aaaccaagga gggagtgggt catggtgtgg	420
caacagtggc tgagaagacc aaagagcaag tgacaaatgt tggaggagca gtggtgacgg	480
gtgtgacagc agtagccag aagacagtgg agggagcagg gagcattgca gcagccactg	540
gctttgtcaa aaaggaccag ttgggcaaga atgaagaagg agccccacag gaaggaaatc	600
tgggaagatat gctgtggat cctgacaatg aggttatga aatgccttct gaggaagggc	660
atcaagaacta cgaacctgaa gctaagaaa tatctttgct ccagtttct tgagatctgc	720
tgacagatgt tccatcctgt acaagtgtc agttccaatg tgcccagtc tgacattct	780
caaagttttt acagtgtatc tgaagtctt ccacagcag tgattgaagt atctgtacct	840

# ES 2 967 530 T3

gcccccaactc agcattttcgg tgcctccctt tcaactgaagt gaatacatgg tagcagggtc 900  
 tttgtgtgtt gtggattttt tggcttcaat ctacgatgtt aaaacaaaatt aaaaacacct 960  
 aagtgaactac cacttatttc taaatccctc ctattttttt gttgctgttg ttcagaagtt 1020  
 gttagtgaatt tgctatcata tattataaga tttttagggtg tcttttaattg atactgtcta 1080  
 agaataatga cgtattgtga aatttgitaa tatatataat acttaaaaaat atgtgagcat 1140  
 gaaactatgc acctataaat actaaatatg aaattttacc attttgcat gtgttttatt 1200  
 cacttggtgtt tgtatataaa tggtgagaat taaaaataaaa cgttatctca ttgcataaat 1260  
 attttatttt tatcccatct cactttaata ataaaaatca tgcattataag caacatgaat 1320  
 taagaactga cacaaggac aaaaatataa agttaataat agccatttga agaaggagga 1380  
 attttagaag aggtagagaa aatggaacat taacctaca ctoggaattc cctgaagcaa 1440  
 cactgocaga agtgtgtttt ggtatgcact ggctccttaa gtggctgtga ttaattattg 1500  
 aaagtgggggt gttgaagacc ccaactacta ttgtagagtg gtctatttct ccttcaatc 1560  
 ctgtcaatgt ttgctttacg tttttgggg aaactgtgtt tgatgtgtat gtgtttataa 1620  
 ttgttataca tttttaattg agccttttat taacatatat tgttattttt gtctcgaaat 1680  
 aatttttttag ttaaaatcta tttgtctga tattgggtgtg aatgctgtac cttctgaca 1740  
 ataaataata ttgcaccatg aataaaaaaa aaaaaaaagt gggttcccg gaactaagca 1800  
 gtgtagaaga tgattttgac tacacctcc ttagagagcc ataagacaca ttagcacata 1860  
 ttagcacatt caaggctctg agagaatgtg gttaaactttg ttaactcag cattcctcac 1920  
 tttttttttt taatcatcag aaattctctc tctctctctc tctttttctc tgcctctctt 1980  
 tttttttttt tttttacagg aaatgccttt aaacatcgtt ggaactacca ggtcacctt 2040  
 aaaggagatc aattctctag actgataaaa atttcatggc ctcttttaa tgttgcaaaa 2100  
 tatatgaatt ctaggatttt tcttaggaa aggtttttct ctttcaggga agatctatta 2160  
 actccccatg ggtgctgaaa ataaacttga tggtgaaaaa ctctgtataa attaatttaa 2220  
 aaattatttg gtttctctt ttaattattc tggggcatag tcatttctaa aagtcactag 2280  
 tagaaagtat aatttcaaga cagaatttc tagacatgct agcagtttat atgtattcat 2340  
 gagtaatgtg atatatattg ggctctgtg aggaaggaag gaggaatgag tgactataag 2400  
 gatggttacc atagaaactt ctttttttac ctaattgaag agagactact acagagtgtc 2460  
 aagctgcacg tgtcatctta cactagagag aaatggtaag tttcttgtt tatttaagtt 2520  
 atgttttaagc aaggaaagga tttgttattg aacagtatat ttcaggaagg ttgaaagtg 2580  
 goggttagga tatattttta atctacctaa agcagcatat tttaaaaatt taaaagtatt 2640

	ggtattaaat taagaaatag aggacagAAC tagactgata gcagtgcct agaacaattt	2700
	gagattagga aagttgtgac catgaattta aggaattatg tggatacaaa ttctccttta	2760
	aagtgtttct tcccttaata tttatctgac ggtaattttt gagcagtga ttactttata	2820
	tatcttaata gtttatttgg gaccaaAcac ttaaacaAAA agttctttta gtcataaag	2880
	ccttttcagg aagcttgtct catattcact ccagagacat tcacctgcca agtggcctga	2940
	ggatcaatcc agtcttaggt ttattttgca gacttacatt ctcccaagtt attcagcttc	3000
	atatgactcc acggtcggct ttaccaaAac agttcagagt gcactttggc acacaattgg	3060
	gaacagaaca Atctaattgtg tggtttggta tcccaagttg ggtctttttc agaattctctg	3120
	cactagtgtg agatgcaaac atgtttcctc atctttcttg cttatccagt atgtagctat	3180
	ttgtgacata ataaatatat acatatatga aaata	3215
5	<210> 8 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip dirigido a la región 499-517 del ARNm de alfa sinucleína, hebra sentido	
	<400> 8 agaagacagu ggagggagct t	21
15	<210> 9 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip dirigido a la región 499-517 del ARNm de alfa sinucleína, hebra antisentido	
	<400> 9 gacccuucca cugucucut t	21
25	<210> 10 <211> 110 <212> ADN <213> Homo sapiens	
30	<400> 10 ttggatgttg gcctagtctt gtgtggaaga ctagtgattt tgttgttttt agataactaa	60
	atcgacaaca aatcacagtc tgcctatagg cacaggccat gcctctacag	110
35	<210> 11 <211> 110 <212> ADN <213> Homo sapiens	
	<400> 11 ctggatacag agtggaccgg ctggccccat ctggaagact agtgattttg ttgttgtctt	60
40	actgcgctca acaacaactc ccagtctacc taatgggtgc agccatcgca	110

<210> 12  
 <211> 110  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 12  
 agattagagt ggctgtggto tagtgetgtg tygaagacta gtgattttgt tgtttgatg 60  
 tactacgaca acaagtcaca gccggcctca tagcgcagac tcccttegac 110  
 <210> 13  
 10 <211> 90  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 ctcacagctg ccagtgtoat ttttgtgato tgcagctagt attctcacto cagttgcata 60  
 15 gtcacaaaag tgatcattgg caggtgtggc 90  
 <210> 14  
 <211> 87  
 <212> ADN  
 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 14  
 agcgggtggcc agtgtcattt ttgtgatgtt gcagctagta atatgagccc agttgcatag 60  
 tcacaaaagt gatcattgga aactgtg 87  
 25 <210> 15  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 15  
 uggaagacua gugaauuugu ug 22  
 <210> 16  
 <211> 22  
 35 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 16  
 uugcauaguc acaaaaguga uc 22  
 40 <210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 17  
 His Ala Ile Tyr Pro Arg His  
 1 5  
 50 <210> 18  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 18

Thr His Arg Pro Pro Met Trp Ser Pro Val Trp Pro  
1 5 10

<210> 19

<211> 16

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> sonda APN

10

<400> 19

gaagacagtg gagggg

16

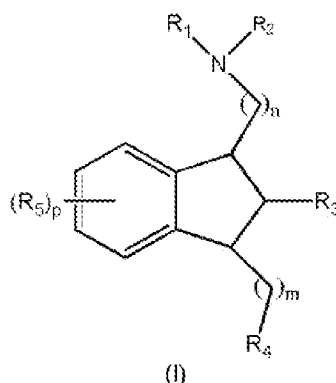


## REVINDICACIONES

## 1. Un conjugado que comprende

- i) al menos un agente de selectividad que es un inhibidor de recaptación triple (IRSND) y  
 ii) al menos un ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a una molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador de neurotransmisor en donde dicha molécula diana es el ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína, y

en donde el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente al ARNm de alfa-sinucleína se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región localizada en las posiciones 499-516 (SEQ ID NO: 5), 448-465 (SEQ ID NO: 4) y 502-519 (SEQ ID NO: 6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína definida en el número de acceso del NCBI NM\_000345 (SEQ ID NO: 7) y en donde el inhibidor de recaptación triple tiene la siguiente estructura (I)



en donde

$n$  o  $m$  son números enteros que tiene cada uno un valor entre 0 y 6, inclusive;

$p$  es un número entero que tiene un valor entre 0 y 4, inclusive;

$R_1$  es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-C(=O)R_A$ ;  $-CO_2R_A$ ;  $-C(=O)N(R_A)_2$  o  $-C(R_A)_3$ ; en donde cada aparición de  $R_A$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxi; o fracción heteroariltio;

$R_2$  es hidrógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-C(=O)R_B$ ;  $-CO_2R_B$ ;  $-C(=O)N(R_B)_2$  o  $-C(R_B)_3$ ; en donde cada aparición de  $R_B$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxi; o fracción heteroariltio;

$R_3$  es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-OR_C$ ;  $-C(=O)R_C$ ;  $-CO_2R_C$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_C$ ;  $-SOR_C$ ;  $SO_2R_C$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_C)_2$ ;  $-NHC(=O)R_C$ ;  $-NR_CC(=O)N(R_C)_2$ ;  $-OC(=O)OR_C$ ;  $-OC(=O)R_C$ ;  $-OC(=O)N(R_C)_2$ ;  $-NR_CC(=O)OR_C$ ; o  $-C(R_C)_3$ ; en donde cada aparición de  $R_C$  es independientemente un hidrógeno, un grupo protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxi; o fracción heteroariltio;

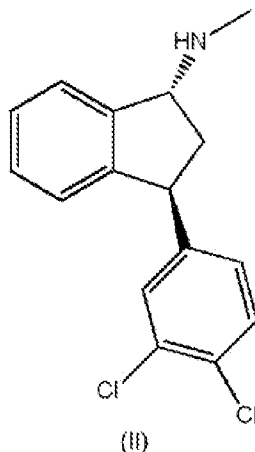
$R_4$  es arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; o heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;

$R_5$  es hidrógeno; halógeno; alifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroalifático cíclico o acíclico, sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; acilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; arilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar; heteroarilo sustituido o sin sustituir, ramificado o sin ramificar;  $-OR_E$ ;  $-C(=O)R_E$ ;  $-CO_2R_E$ ;  $-CN$ ;  $-SCN$ ;  $-SR_E$ ;  $-SOR_E$ ;  $SO_2R_E$ ;  $-NO_2$ ;  $-N_3$ ;  $-N(R_E)_2$ ;  $-NHC(=O)R_E$ ;  $-NR_EC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-OC(=O)OR_E$ ;  $-OC(=O)R_E$ ;  $-OC(=O)N(R_E)_2$ ;  $-NR_EC(=O)OR_E$ ; o  $-C(R_E)_3$  en donde cada aparición de  $R_E$  es independientemente un hidrógeno, un grupo

protector, una fracción alifática, una fracción heteroalifática, una fracción acilo, una fracción arilo; una fracción heteroarilo; alcoxi; ariloxi; alquiltio; ariltio; amino, alquilamino, dialquilamino, heteroariloxo; o fracción heteroariltio; y formas farmacéuticamente aceptables del mismo

2. El conjugado según la reivindicación 1 en donde la unión del ácido a la molécula diana produce una inhibición de la actividad de  $\alpha$ -sinucleína o el silenciamiento del ARNm que codifica  $\alpha$ -sinucleína.

3. El conjugado según la reivindicación 1 en donde el inhibidor triple de recaptación tiene la estructura (II)



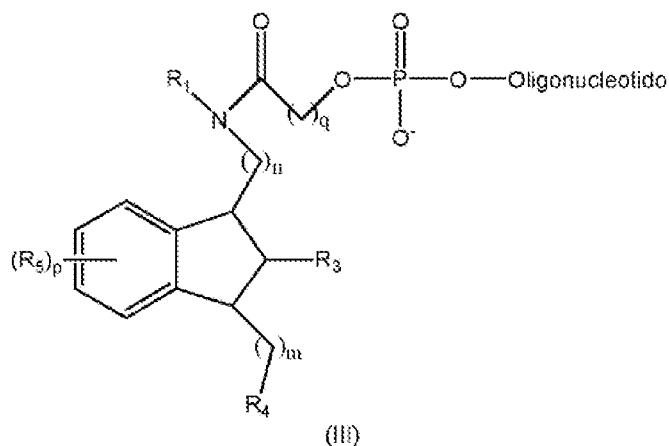
4. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde el ácido nucleico que es capaz de unirse específicamente a la molécula diana que se expresa en la misma célula que el transportador de neurotransmisor se selecciona del grupo que consiste en un gapmero, ARN interferente bicatenario, un ARN bicatenario con actividad de microARN, un oligonucleótido antisentido, un antiMicro ARN, preMiARN, un ARNm que codifica microARN o ARNh<sub>c</sub>, un APN, un ANB, una ribozima y un aptámero.

5. El conjugado según la reivindicación 4 en donde el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido o un gapmero.

6. El conjugado según la reivindicación 5 en donde el gapmero comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueado por bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.

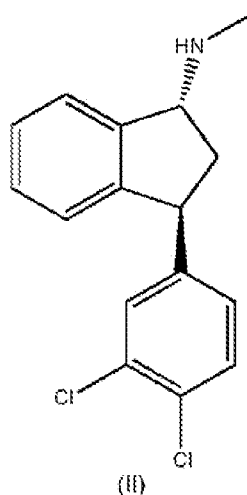
7. El conjugado según la reivindicación 6 en donde el gapmero consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO:3.

8. El conjugado según las reivindicaciones 1 a 7 en donde el conjugado tiene la estructura (III)

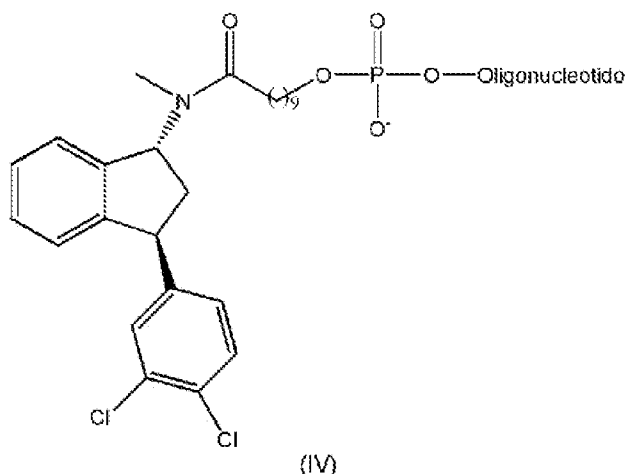


en donde n, m, p, R<sub>1</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub> y R<sub>5</sub> son como se han definido en la reivindicación 4 y en donde q es un número entero que tiene un valor entre 0 y 20 inclusive y formas farmacéuticamente aceptables del mismo.

9. El conjugado según la reivindicación 8 en donde el oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido o un gapmero.
10. El conjugado según la reivindicación 9 en donde el gapmero comprende un bloque central de 10 desoxinucleótidos flanqueado por 2 bloques de 4 ribonucleótidos 2'-O-metil modificados.
11. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 en donde el oligonucleótido se dirige a una región en el ARNm de alfa-sinucleína seleccionada del grupo que consiste en una región situada en las posiciones 499-516 (SEQ ID NO:5), 448-465 (SEQ ID NO:4) y 502-519 (SEQ ID NO:6) del ARNm de alfa-sinucleína humana en donde la numeración corresponde a la posición con respecto al primer nucleótido en la secuencia de alfa-sinucleína como se define en el número de acceso de NCB: NM\_000345 (SEQ ID NO:7).
12. El conjugado según la reivindicación 11 en donde el ácido nucleico consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID:2, SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:3.
13. El conjugado como se define en la reivindicación 12 en donde el agente de selectividad tiene la estructura (II)

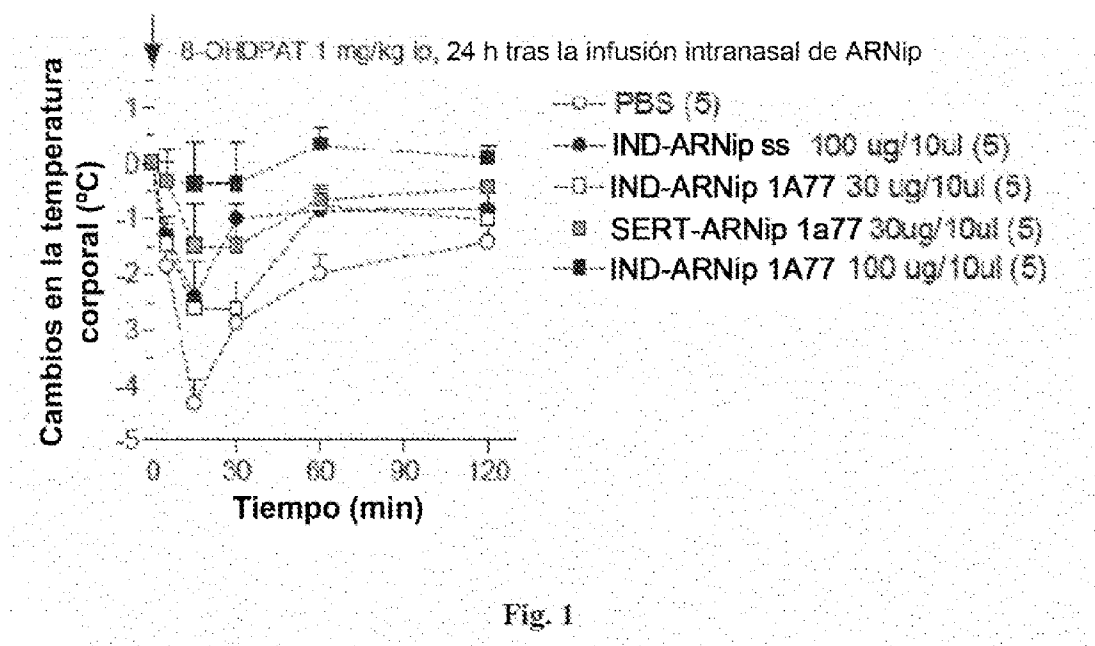


14. El conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 que tiene la estructura (IV)



15. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en medicina.
16. Un conjugado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy.
17. El conjugado para su uso según la reivindicación 16 en donde la enfermedad asociada con el depósito de cuerpos de Lewy se selecciona del grupo de enfermedad de Parkinson, demencia con cuerpos de Lewy y atrofia multisistémica.

18. Un conjugado para su uso según las reivindicaciones 16 o 17 en donde el conjugado se administra por vía intraventricular o intranasal.



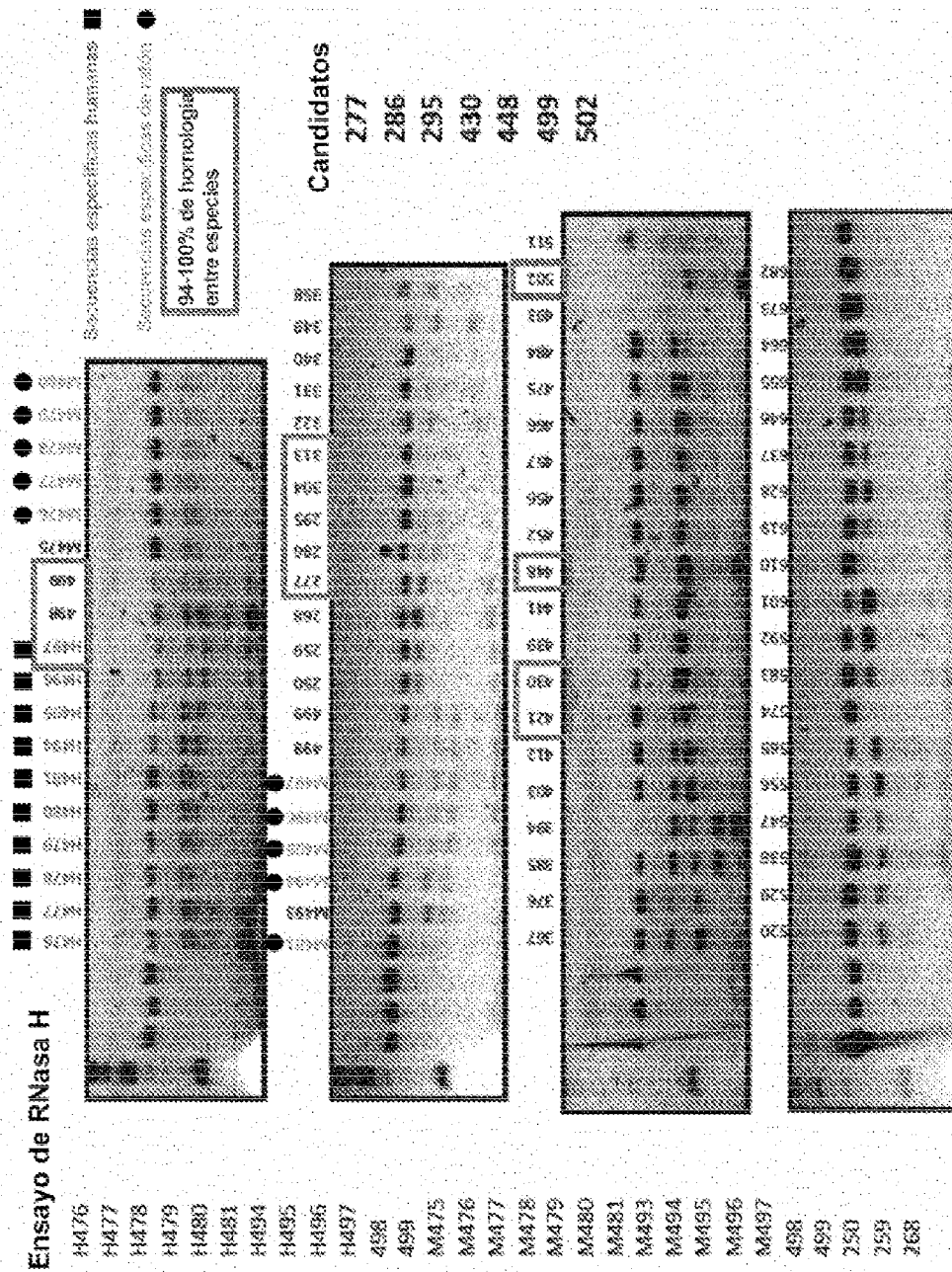


Fig. 2

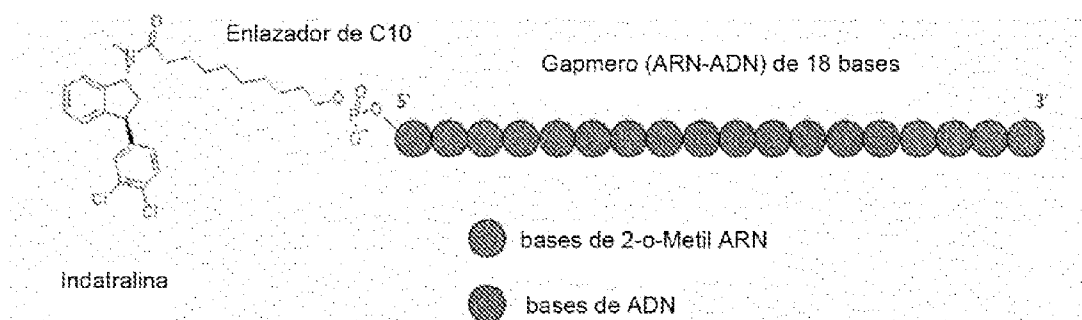


Fig. 3

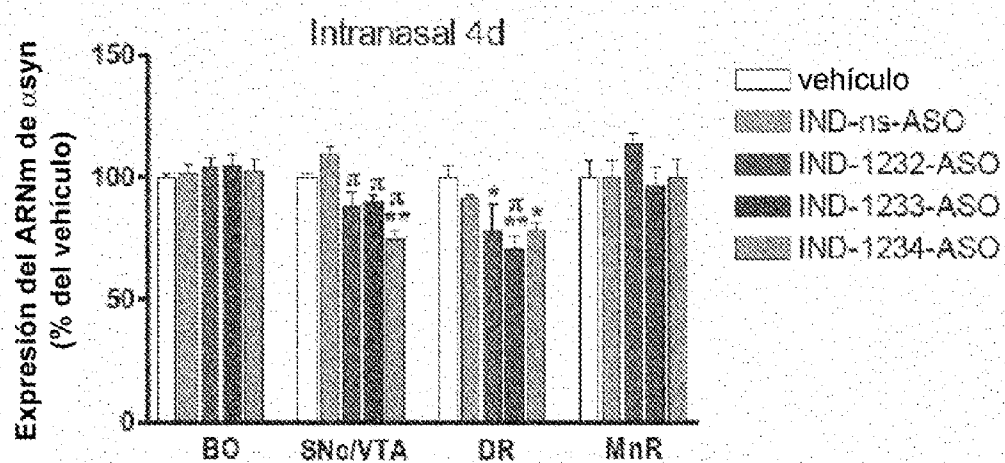
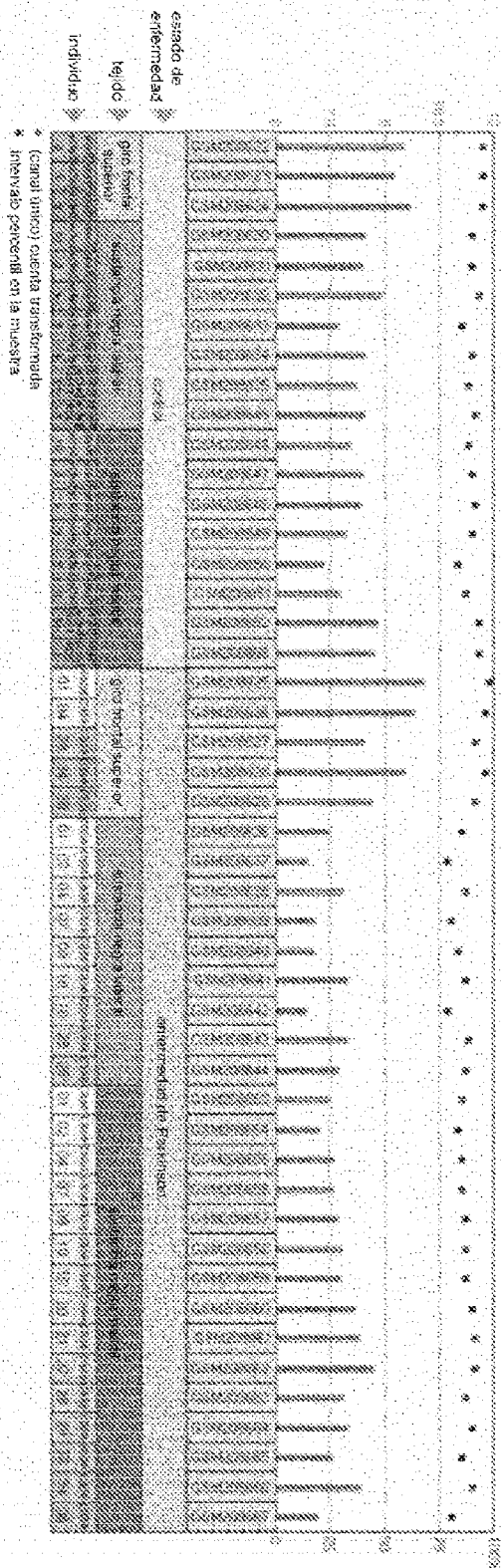
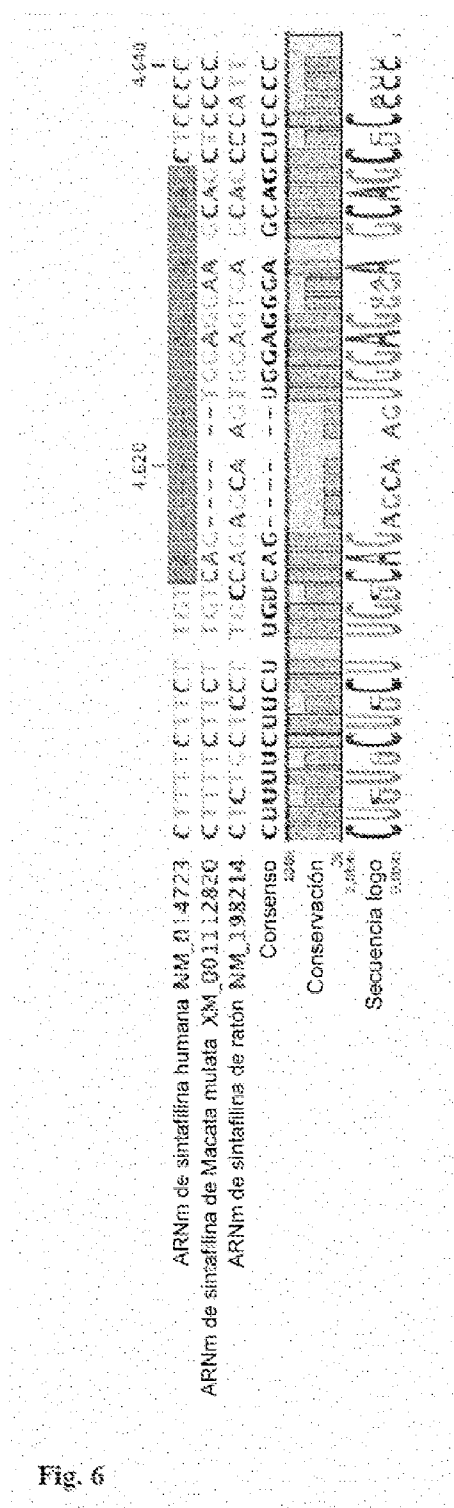


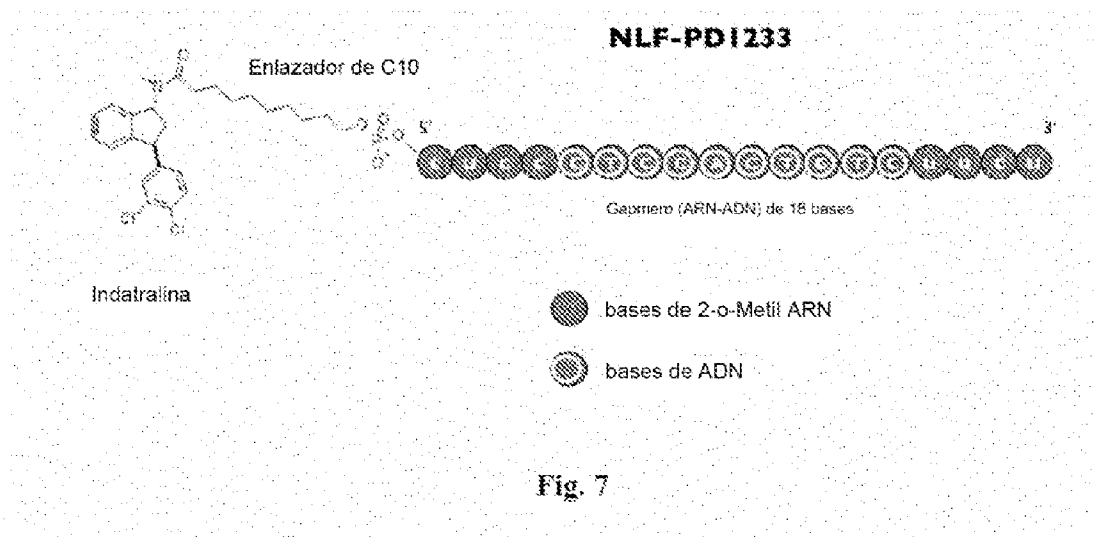
Fig. 4

00000000000000000000000000000000









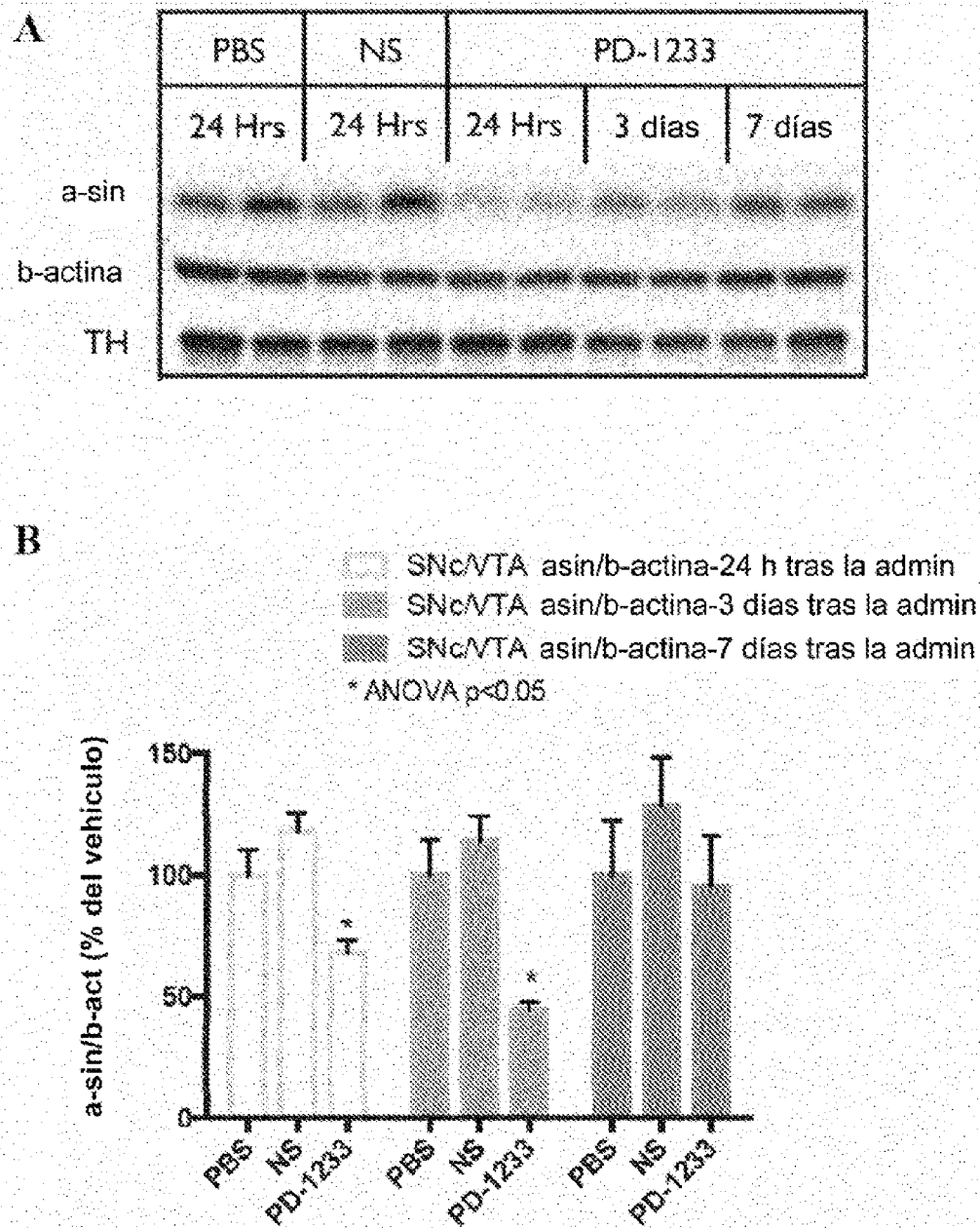
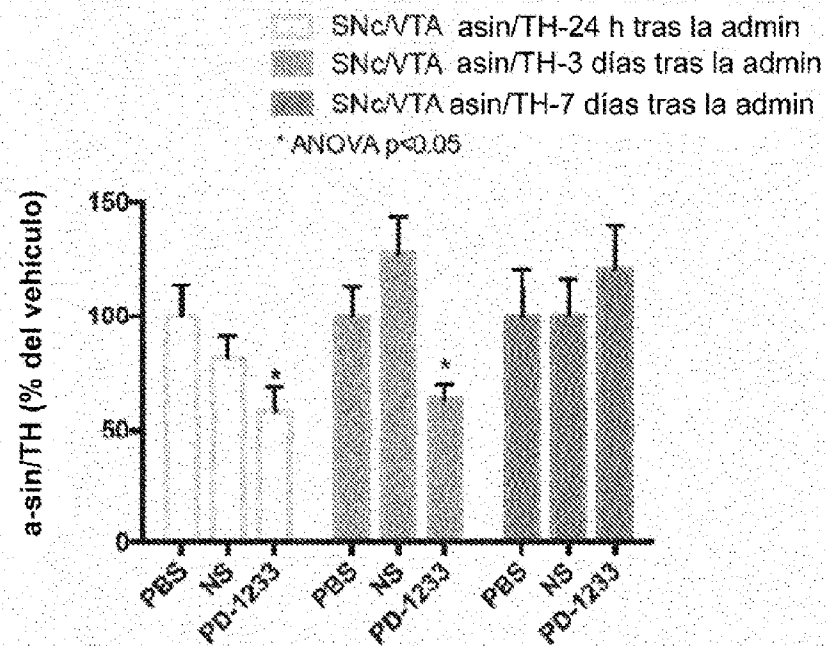


Fig. 8

**C**



**D**

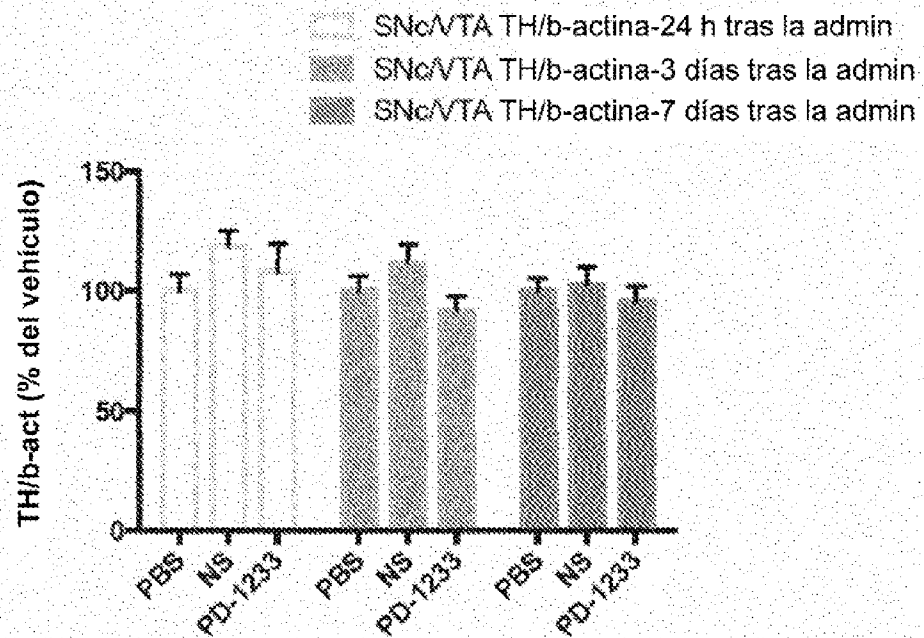


Fig. 8 (cont.)

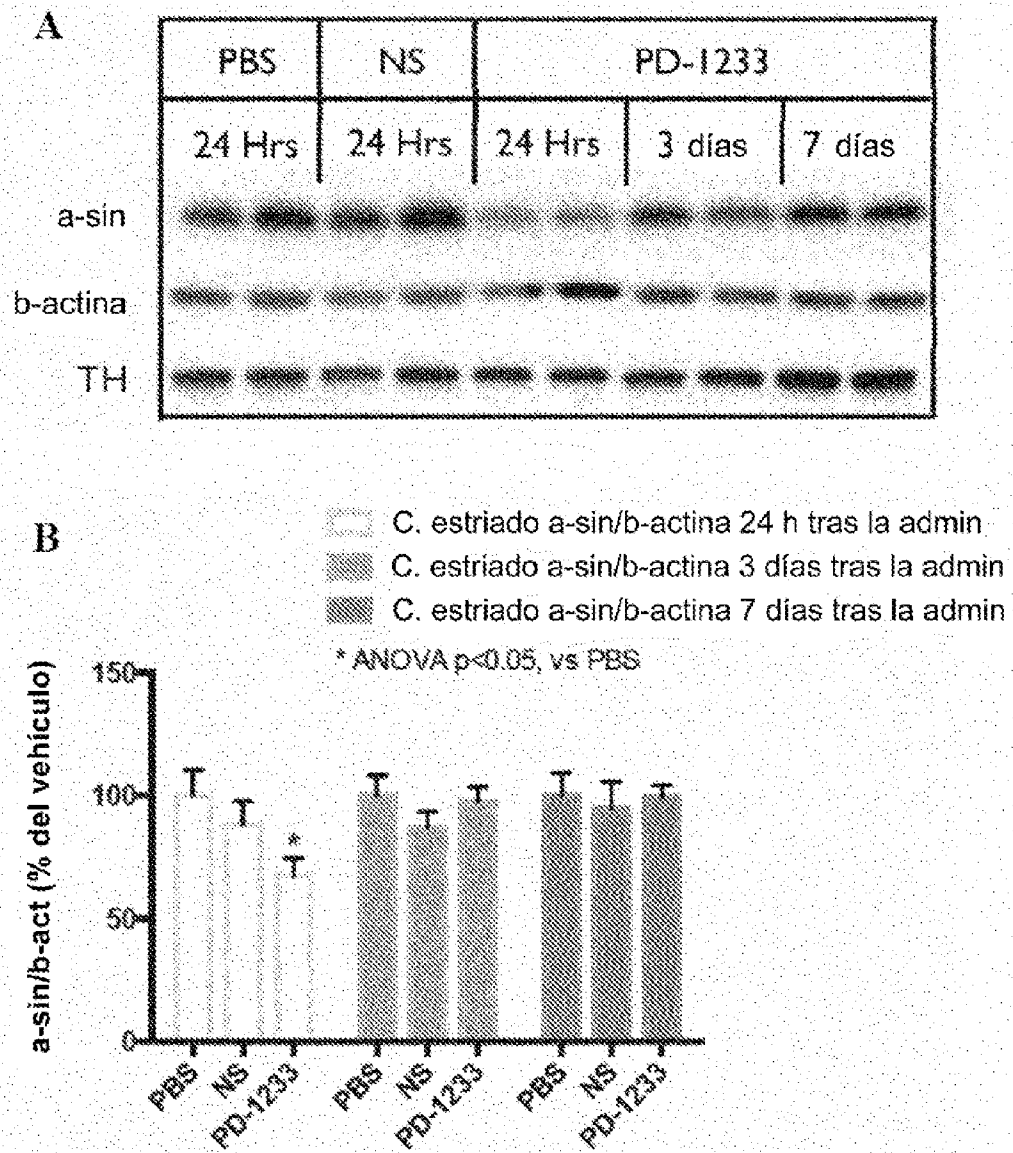


Fig. 9

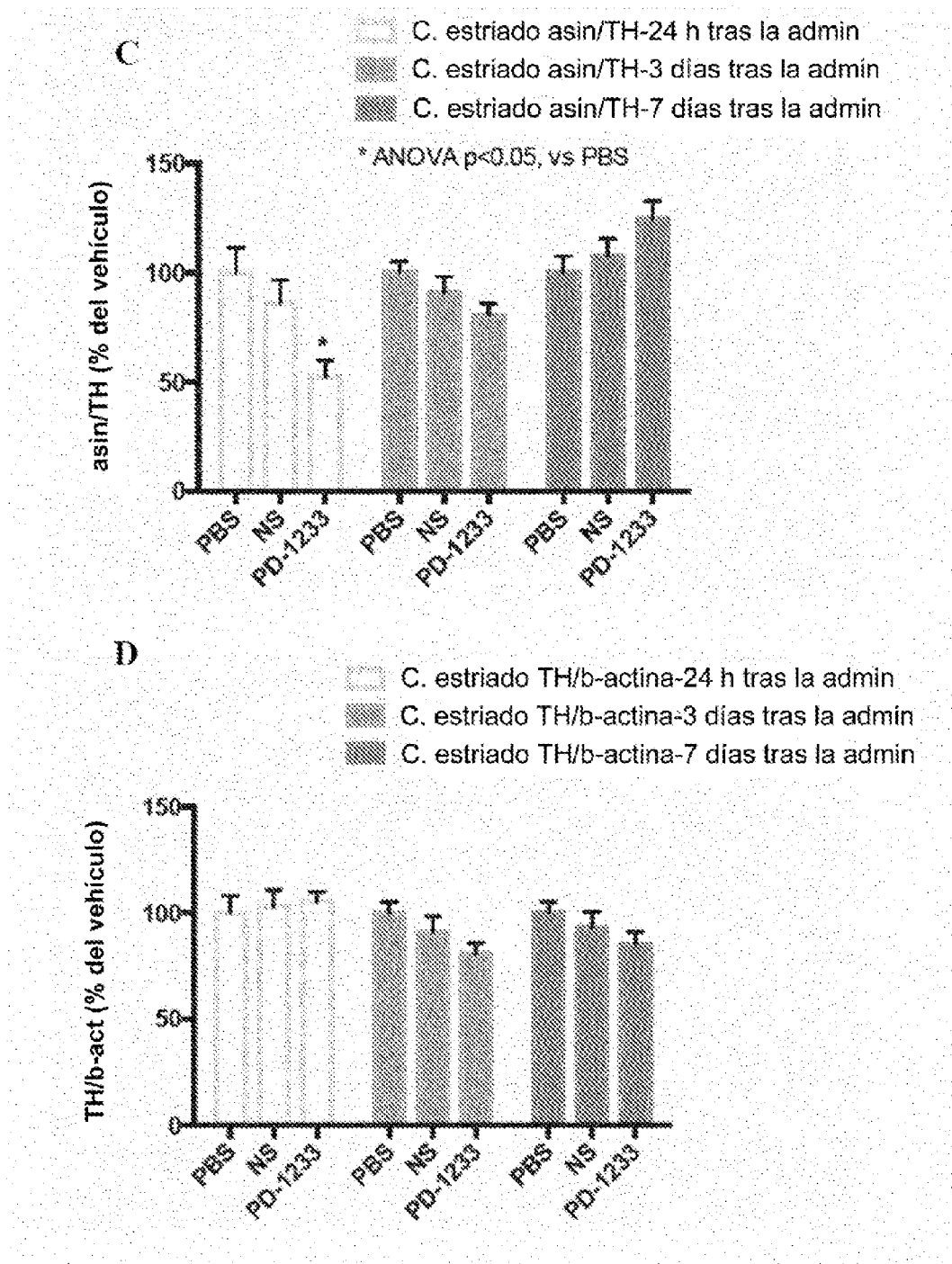


Fig. 9 (cont.)

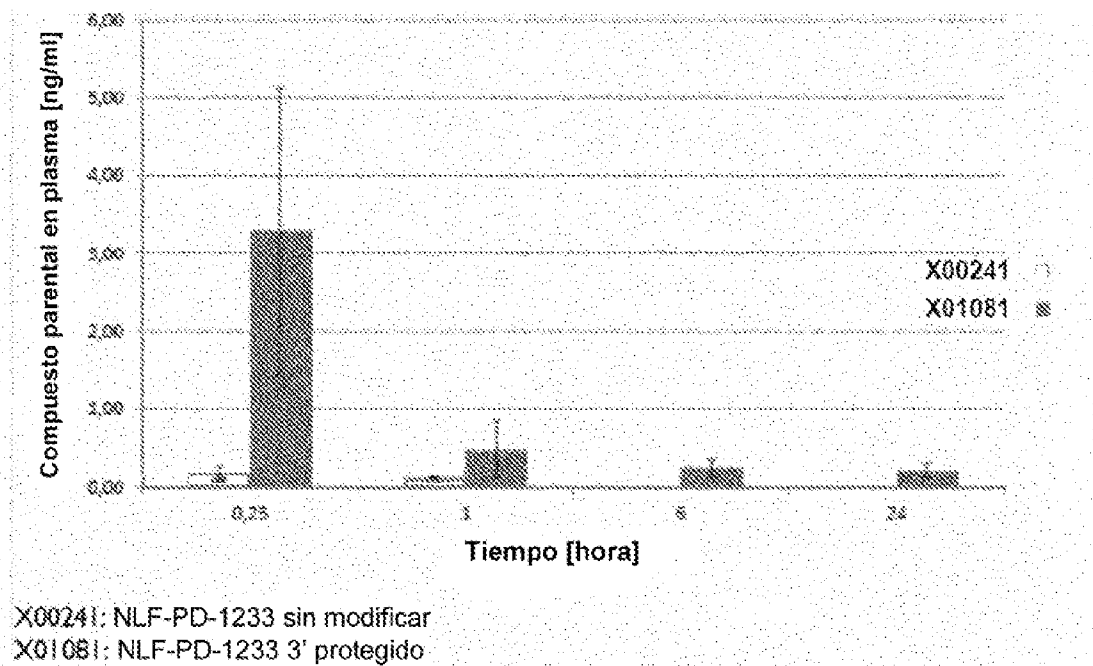


Fig. 10

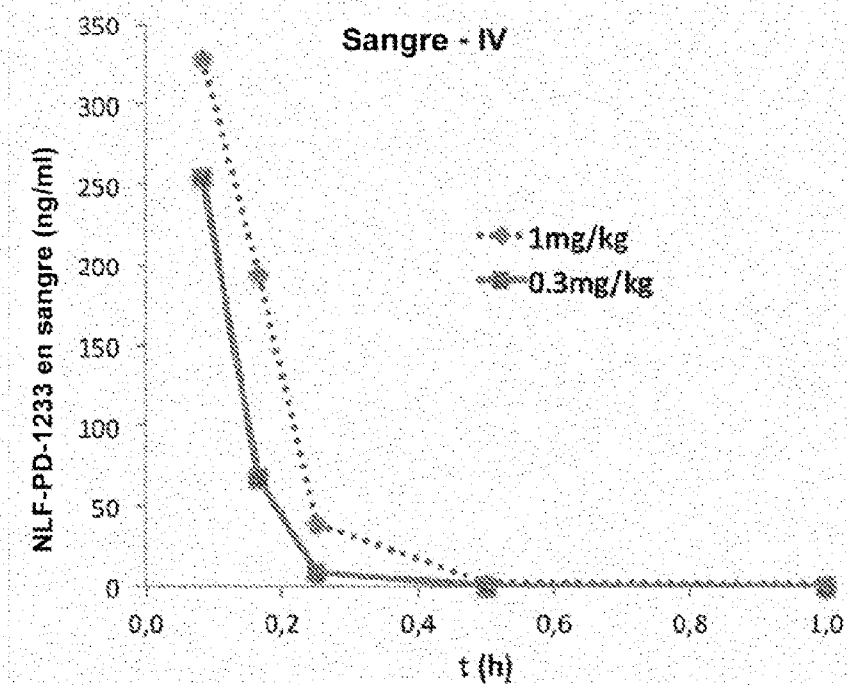


Fig. 11

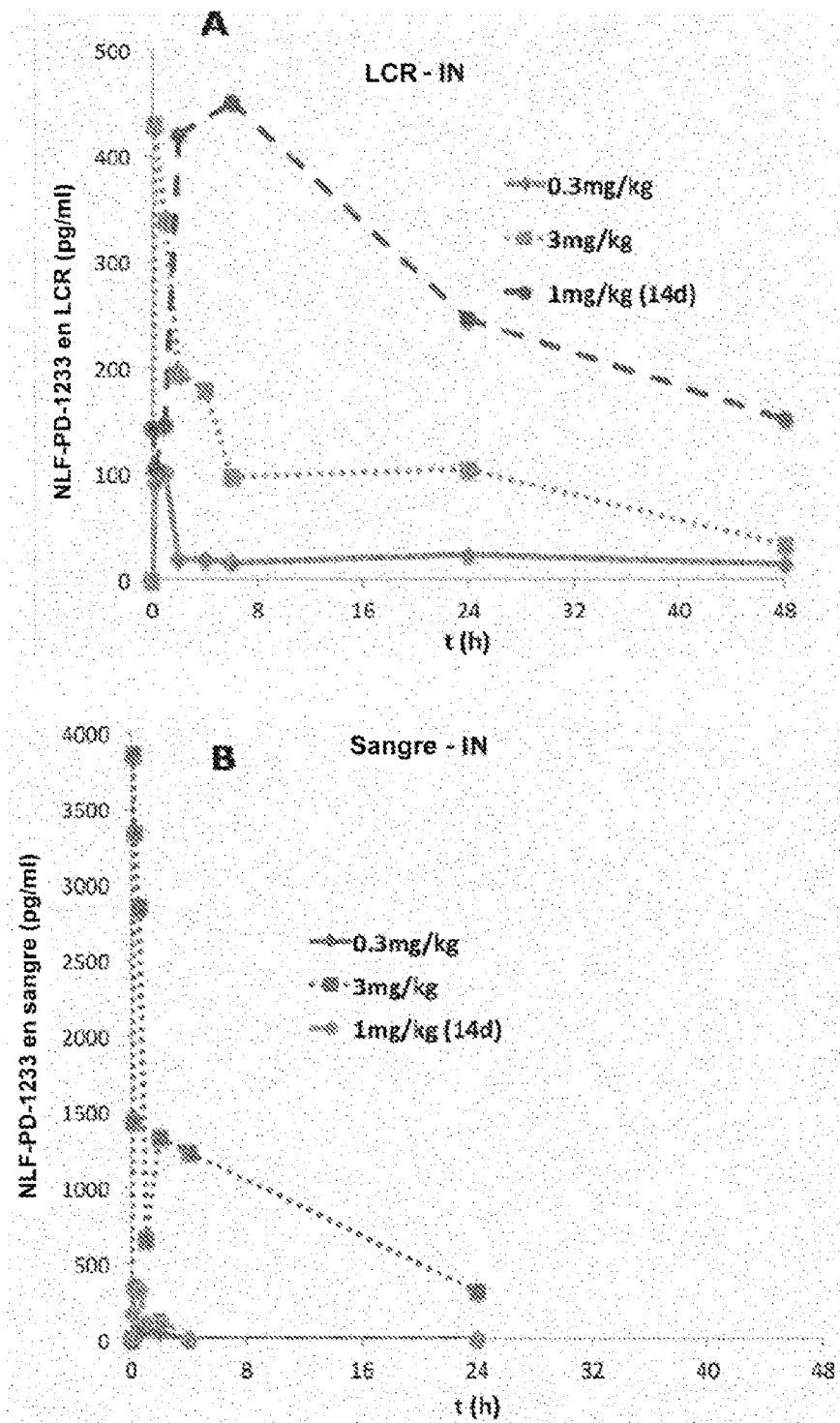


Fig. 12



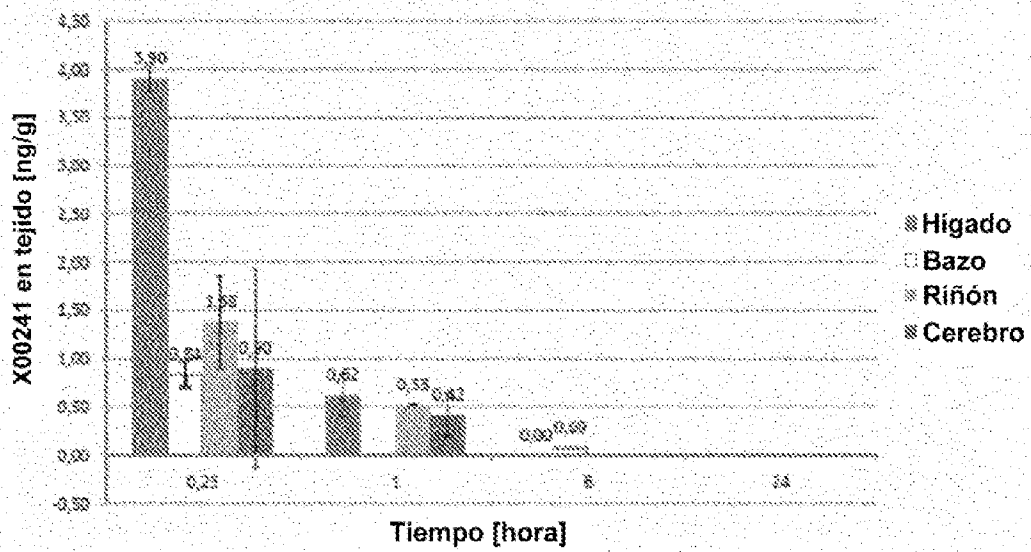


Fig. 13

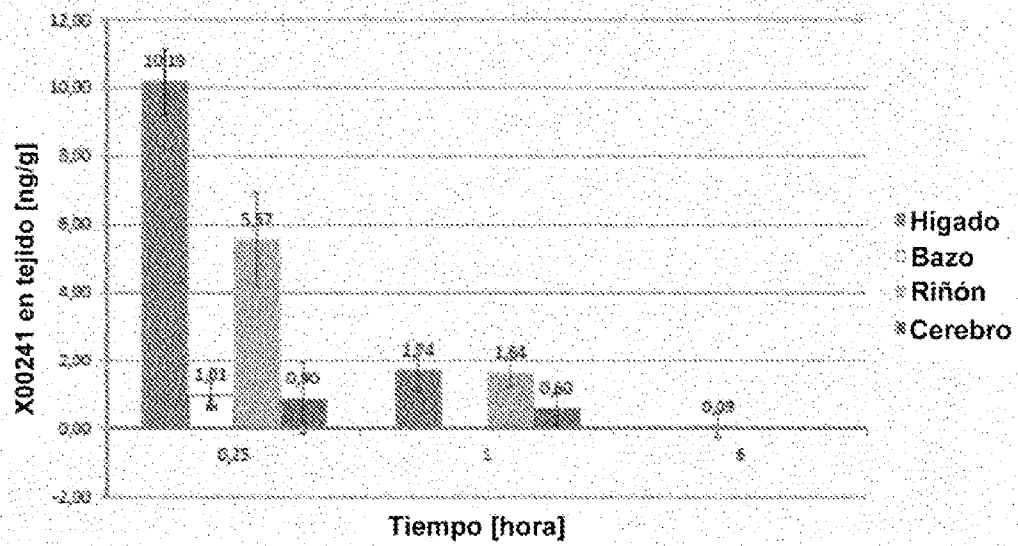


Fig. 14

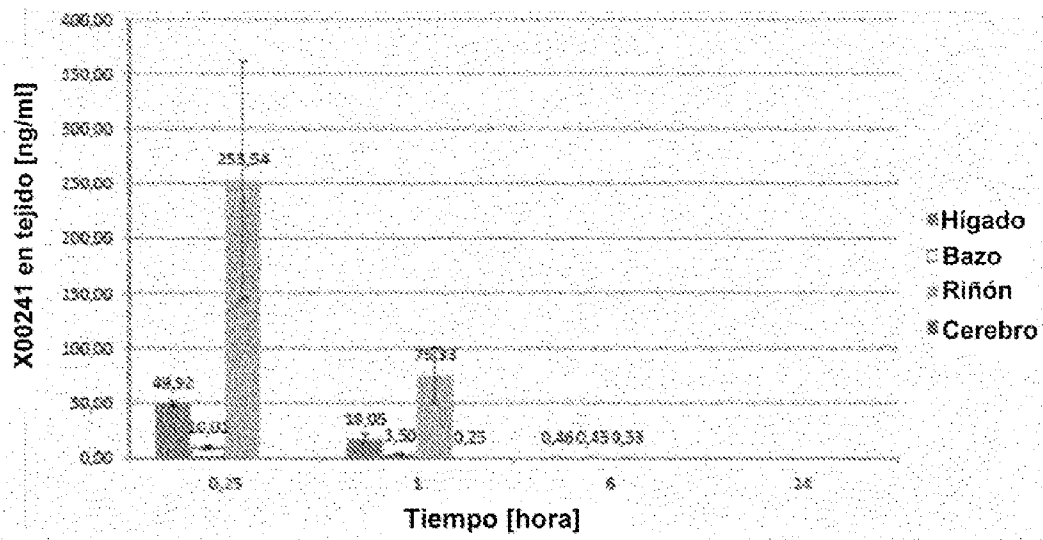


Fig. 15

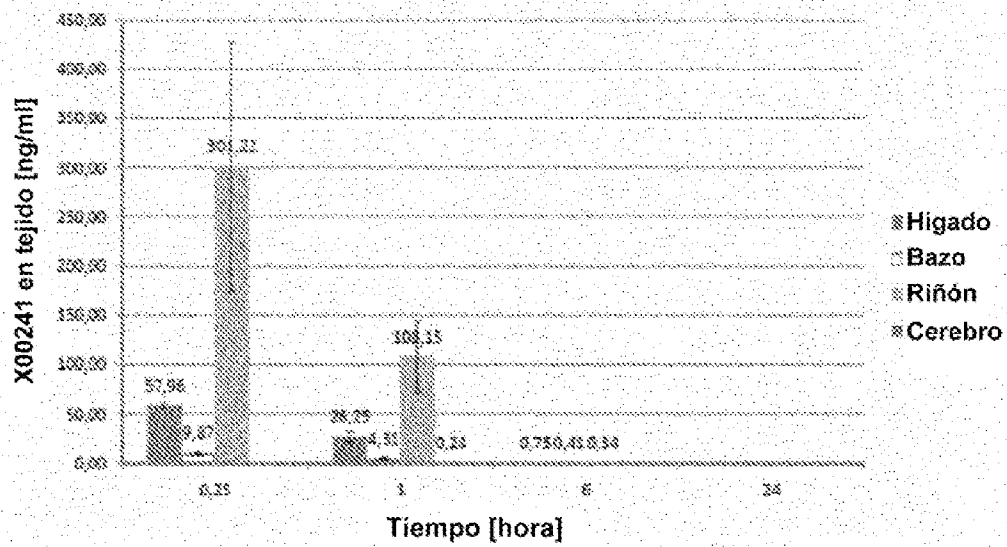
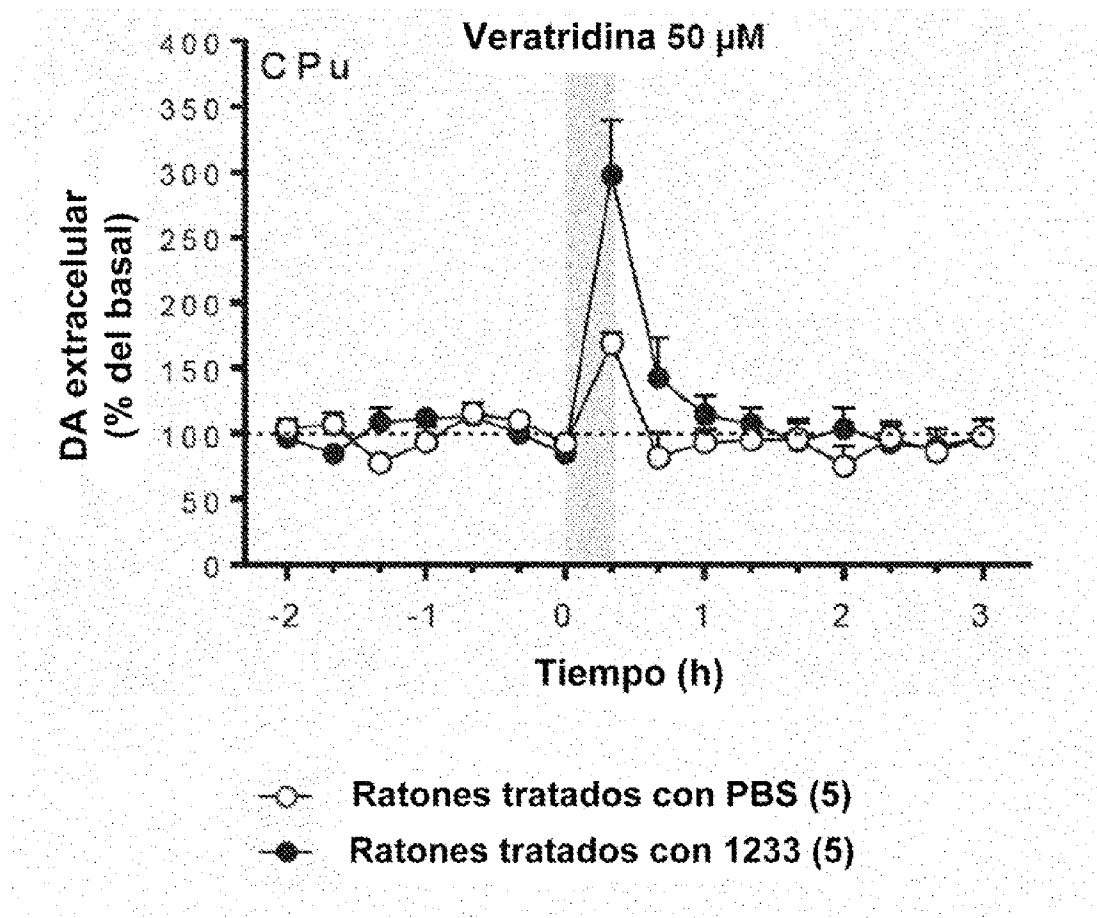
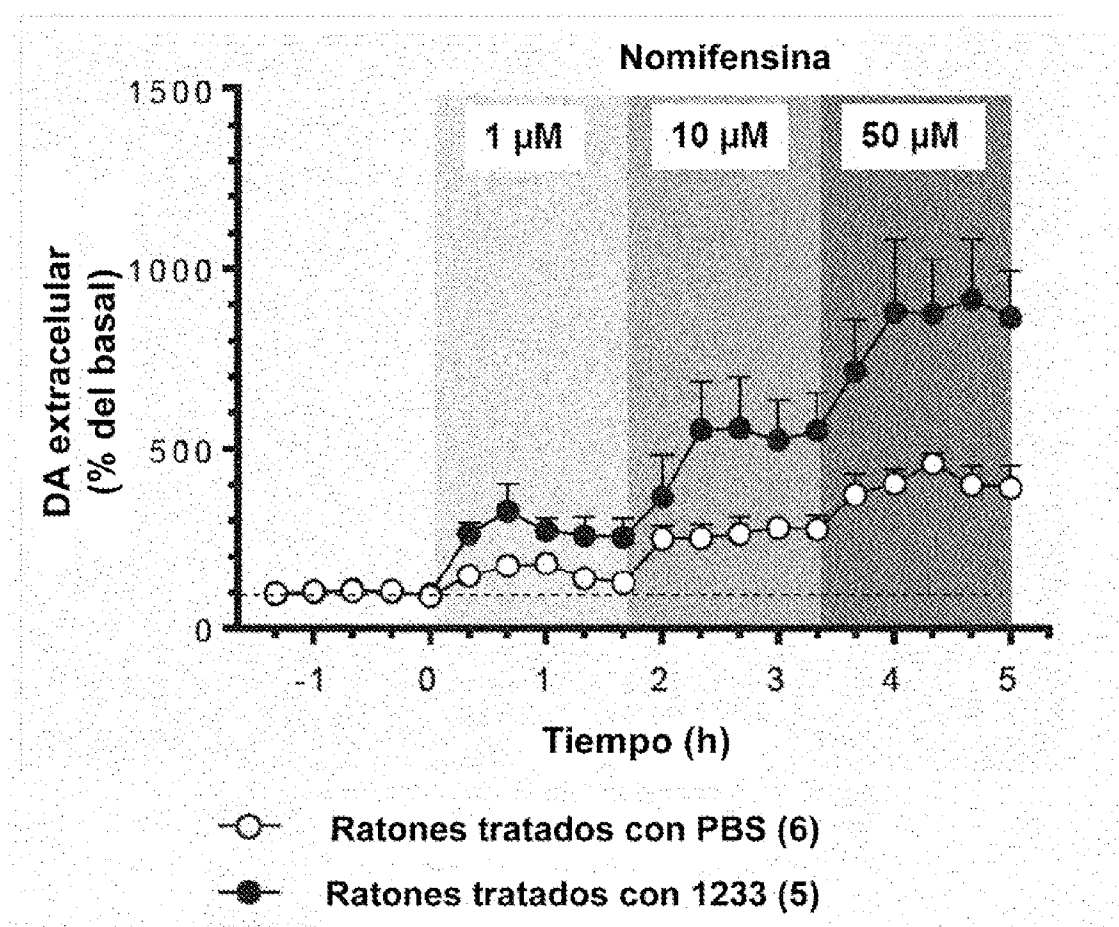


Fig. 16



Fuente de variación	% del total	Valor de P	Valor de P resumen	¿Significativo?
Interacción	13,48	<0,0001	****	Sí
Tiempo	48,35	<0,0001	****	Sí
Grupo	2,631	0,1333	ns	No

Fig. 17



Fuente de variación	% del total	Valor de P	Valor de P resumen	¿Significativo?
Interacción	9,355	<0,0001	****	Sí
Tiempo	51,82	<0,0001	****	Sí
Grupo	13,18	0,0223	*	Sí

Fig. 18