

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 935 606**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 31/7125 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2012 E 18159070 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2022 EP 3399038**

(54) Título: **Análogos de oligonucleótidos dirigidos a LMNA humana**

(30) Prioridad:

08.12.2011 US 201161568590 P

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

08.03.2023

(73) Titular/es:

SAREPTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
215 First Street
Cambridge, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

KOLE, RYSZARD y
BESTWICK, RICHARD KEITH

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

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

ES 2 935 606 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

- Análogos de oligonucleótidos dirigidos a LMNA humana
- 5 Antecedentes
- Campo técnico
- 10 La presente invención se refiere en general a compuestos antisentido dirigidos a lámina A humana para su uso en la modulación del empalme aberrante de un pre-ARNm de LMNA humano.
- 15 Descripción de la técnica relacionada
- El síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS, por sus siglas en inglés) es un trastorno genético raro caracterizado por arterioesclerosis prematura y degeneración de las células del músculo liso (SMC, por sus siglas en inglés) vascular. HGPS se manifiesta más notablemente como un envejecimiento prematuro y acelerado en los niños afectados. Los niños con HGPS tienen síntomas progresivos como retraso del crecimiento, alopecia, pérdida de grasa subcutánea y anomalías óseas. La esperanza de vida promedio es de 12 años y la causa más común de muerte es el infarto de miocardio o el accidente cerebrovascular.
- 20 La mayoría de los casos de HGPS son causados por una mutación de un solo punto en el gen de la lámina A (LMNA), lo que resulta en la generación de progerina, un mutante de empalme truncado de la lámina A. La mutación de un solo punto es una sustitución *de novo* silenciosa (1824C>T, Gly608Gly) en el exón 11 del gen de la lámina A (LMNA). La sustitución activa un sitio donante de empalme críptico, lo que conduce a la producción de una proteína lámina A mutante negativa dominante con una delección interna de 50 aminoácidos. La proteína mutante, llamada progerina, se acumula en la membrana nuclear, provocando una vesícula nuclear característica ((Scaffidi y Misteli 2005; Cao, Blair et al. 2011)).
- 25 Se sabe que el empalme aberrante se puede corregir utilizando oligonucleótidos de fosforodiamidato morfolino (PMO, por sus siglas en inglés), o más específicamente, oligonucleótidos de cambio de empalme (SSO, por sus siglas en inglés). Los SSO bloquean los sitios de empalme aberrantes mediante la hibridación en los sitios o cerca de ellos, lo que impide el reconocimiento por parte de la maquinaria de empalme celular. Los SSO preferidos son resistentes a las nucleasas y la estructura de doble cadena resultante elimina la posibilidad de que la ARNasa H escinda el ARN. Se ha demostrado que los SSO reparan eficazmente el patrón de empalme tanto *in vitro* e *in vivo* para talasemia y distrofia muscular de Duchenne. (Kinali, Arechavala-Gomeza et al. 2009; Swasti, Suwanmanee et al. 2009). Se ha demostrado que el empalme aberrante de LMNA asociado con HGPS se reduce mediante la corrección del evento de empalme aberrante utilizando oligonucleótidos antisentido modificados dirigidos al sitio de empalme críptico activado tanto en cultivo celular (Scaffidi y Misteli 2005) como en un modelo animal relevante (Osorio, Navarro et al. 2011).
- 30 Dada la función de LMNA en HGPS, se necesitan oligonucleótidos que modulen el empalme de pre-ARNm de LMNA para eliminar la expresión de progerina.
- 35 Fernando G. Osorio et al., "Terapia dirigida por empalme en un nuevo modelo de ratón de envejecimiento humano acelerado", Science Translational Medicine, Asociación Estadounidense para el Avance de la Ciencia, vol. 3, núm. 106, páginas 145-155 relaciona, en el contexto del síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (HGPS) con una terapia basada en morfolino antisentido que previene el empalme patógeno de Lmna, reduciendo la acumulación de progerina y sus defectos nucleares asociados.
- 40 El documento WO 2007/047913 A2 divulga compuestos, composiciones y métodos para modular la expresión de LMNA en una célula, tejido o animal.
- 45 Paola Scaffidi et al., "Reversión del fenotipo celular en la enfermedad de envejecimiento prematuro síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford", Nature Medicine, vol. 11, núm. 43, páginas 440-445 se refiere a la corrección del empalme aberrante en el transcripto de lámina A endógena en células HGPS.
- 50 Loren G. Pong et al., "Activación de la síntesis de progerina, la prelámina A mutante en el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford, con oligonucleótidos antisentido", Human Molecular Genetics, vol. 18, núm. 13, páginas 2462-2471 muestra que los oligonucleótidos antisentido contra las secuencias del exón 11 corriente abajo del sitio donante de empalme del exón 11 promueven el empalme alternativo tanto en fibroblastos de tipo silvestre como HGPS, aumentando la síntesis de progerina.
- 55 Breve descripción de la invención
- 60 La presente invención se expone en las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, la presente invención se refiere a oligonucleótidos antisentido para su uso en la modulación del empalme aberrante de un pre-ARNm de LMNA humano, donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido morfolino de fosforodiamidato; donde el oligonucleótido antisentido tiene 25 nucleobases; y donde el oligonucleótido antisentido

comprende una secuencia de direccionamiento que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 4 u 11.

En realizaciones más específicas, la secuencia de direccionamiento del oligonucleótido es complementaria a las bases cadena arriba del sitio de empalme críptico del exón 11 de un pre-ARNm de LMNA humano. En otras realizaciones específicas, la secuencia de direccionamiento es complementaria a las bases cadena abajo del sitio de empalme críptico del exón 11 de un pre-ARNm de LMNA humano. En aún otras realizaciones específicas, la secuencia de direccionamiento no se solapa con el sitio de empalme críptico del exón 11 del pre-ARNm de LMNA humano.

5 En realizaciones adicionales, la secuencia de direccionamiento en el oligonucleótido para uso en la invención no se superpone con la mutación 1824C>T.

10 En otra realización específica, la base más 3' de la secuencia de direccionamiento es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está aproximadamente 1-30 bases corriente abajo del sitio de empalme críptico del exón 11 de un pre-ARNm de LMNA humano.

15 En otra realización específica, la base más 3' de la secuencia de direccionamiento es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está aproximadamente 1-30 bases corriente abajo del sitio de empalme críptico del exón 11 de un pre-ARNm de LMNA humano.

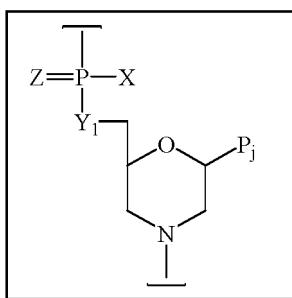
20 En otra realización específica más, la base más 3' de la secuencia de direccionamiento es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que está aproximadamente 10-40 bases cadena arriba del sitio de empalme críptico del exón 11 de un pre-ARNm de LMNA humano.

25 La secuencia de direccionamiento del oligonucleótido, en realizaciones aún más específicas de la invención, comprende SEQ ID NO: 4.

La secuencia de direccionamiento del oligonucleótido, en otras realizaciones más específicas de la invención, comprende SEQ ID NO: 11

30 El oligonucleótido es un oligonucleótido de morfolino fosforodiamidato (PMO), o un PMO que comprende uno o más enlaces entre subunidades que contienen piperazina (PMOplus), o un oligonucleótido PMO-X.

35 Las subunidades de morfolino ejemplares, de acuerdo con ciertas realizaciones de la invención, se unen mediante enlaces fosforodiamidato, de acuerdo con la siguiente estructura:



donde Z es S u O,

40 X = NR¹R² o OR⁶,
Y = O o NR⁷,
y cada dicho enlace se selecciona de:

45 (a) enlace sin carga (a), donde cada uno de R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;

(b1) enlace catiónico (b1), donde X = NR¹R² e Y = O, y NR¹R² representa un piperazino sustituido opcional grupo, tal que R¹R² =

50 -CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR-,

donde

cada R⁴ es H, CH₃ o nulo, y

R³ se selecciona de H, alquilo inferior, C(=NH)NH₂, Z-L-NHC(=NH)NH₂ y

55 [C(O)CHR'NH]_mH, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos de longitud que tiene enlaces seleccionados de alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido de origen natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;

(b2) enlace catiónico (b2), donde $X = NR^1R^2$ y $Y = O$, $R^1 = H$ o CH_3 , y $R^2 = LNR^3R^4R^5$, donde L , R^3 y R^4 se definen como antes, y R^5 es H , alquilo inferior o (alcoxi) alquilo inferior; y
 (b3) enlace catiónico (b3), donde $Y = NR^7$ y $X = OR^6$, y $R^7 = LNR^3R^4R^5$, donde L , R^3 y R^4 y R^5 se definen como antes, y R^6 es H o alquilo inferior; y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de los enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

5

En una realización más específica de la estructura anterior, cada uno de R^1 y R^2 , en enlaces de tipo (a), es metilo.

En otra realización específica de la estructura anterior, al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H , R^4 es H , CH_3 o un par de electrones, y R^3 se selecciona de H , CH_3 , $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$.

10

En otra realización específica de la estructura anterior, al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H , R^4 es un par de electrones y R^3 se selecciona de $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$.

15

En otra realización específica de la estructura anterior, al menos un enlace es del tipo (b1), donde cada R es H , R^4 es un par de electrones y R^3 se selecciona de $C(=NH)NH_2$ y $C(O)-L-NHC(=NH)NH_2$.

En otra realización específica más de la estructura anterior, R^3 es $C(O)-L-NHC(NH)NH_2$, y L es un hidrocarburo que tiene la estructura $-(CH_2)_n$, donde n es 1 a 12.

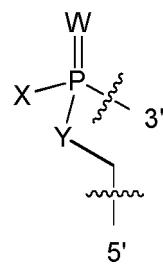
20

En otra realización específica de la estructura anterior, al menos un enlace es de tipo (b1), donde cada R es H , y cada uno de R^3 y R^4 es independientemente H o CH_3 .

En otras realizaciones de la invención, el oligonucleótido antisentido se une covalentemente a un péptido de penetración celular, como un péptido rico en arginina. En una realización más específica, el péptido rico en arginina se une en su extremo C-terminal al extremo 5' del oligonucleótido a través de un conector de uno o dos aminoácidos. Alternativamente, en otra realización, el péptido se une en su extremo C-terminal al extremo 3' del oligonucleótido a través de un conector de uno o dos aminoácidos. En una realización preferida, el péptido de penetración celular se une al oligonucleótido a través de un aminoácido de glicina.

25

En realizaciones adicionales de la invención, se proporciona un oligonucleótido que comprende un esqueleto, comprendiendo el esqueleto una secuencia de estructuras de anillo de morfolino unidas por enlaces entre subunidades, uniendo los enlaces entre subunidades un extremo 3' de una estructura de anillo de morfolino a un extremo 5' de una estructura de anillo de morfolino adyacente, donde cada estructura de anillo de morfolino está unida a un resto de apareamiento de bases, de modo que el oligonucleótido puede unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico objetivo, que comprende una secuencia de direccionamiento que comprende cualquiera de las SEQ ID NO : 4 u 11, donde los enlaces entre subunidades tienen la siguiente estructura general (I):



(I)

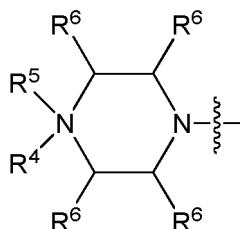
40

o una de sus sales o isómeros, y donde cada uno de los enlaces entre subunidades (I) es independientemente enlace (A) o enlace (B):

donde para el enlace (A):

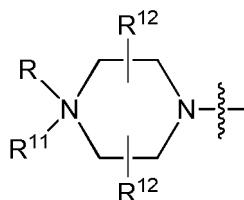
45

W es, cada vez que aparece, independientemente S u O;
 X es, cada vez que aparece, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o ;



(II)

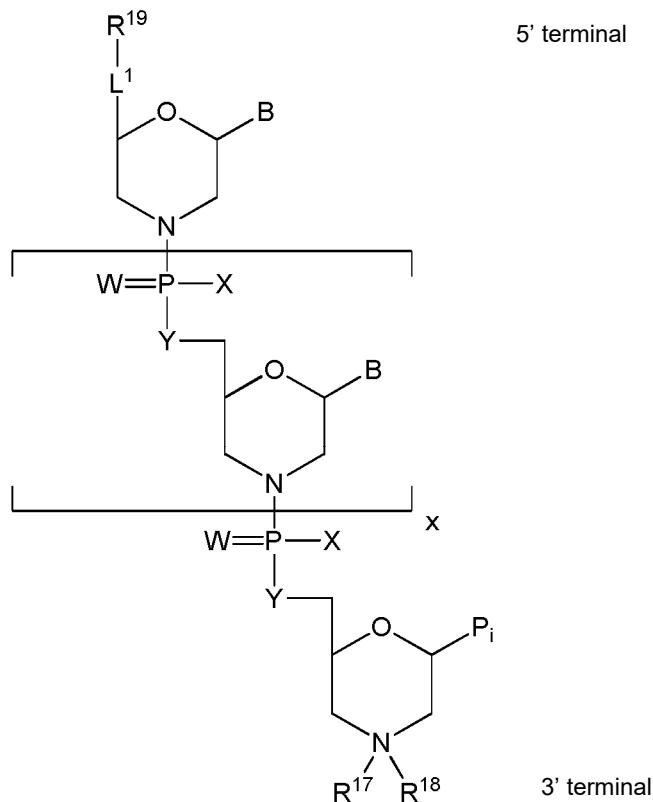
- Y es, cada vez que aparece, independientemente O o -NR²;
- 5 R¹ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo;
- R² es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o -LNR⁴R⁵R⁷;
- R³ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆;
- R⁴ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆, -C(=NH)NH₂, -Z-L-NHC(=NH)NH₂ o -[C(O)CHR'NH]_mH, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;
- 10 R⁵ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;
- R⁶ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo;
- R⁷ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno alquilo C₁-C₆ o alcoxialquilo C₁-C₆;
- L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos; y
- 15 donde para el enlace (B):
- W es, cada vez que aparece, independientemente S u O;
- X es, cada vez que aparece, independientemente -NR⁸R⁹ o -OR³; y
- 20 Y es, cada vez que aparece, independientemente O o -NR¹⁰,
- R⁸ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂;
- R⁹ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo;
- R¹⁰ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o -LNR⁴R⁵R⁷;
- 25 donde R⁸ y R⁹ pueden unirse para formar un heterociclo mono o bicíclico de 5-18 miembros o R⁸, R⁹ o R³ pueden unirse con R¹⁰ para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y donde cuando X es 4-piparazino, X tiene la siguiente estructura (III):



(III)

- 30 donde:
- R¹¹ es, cada vez que aparece, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclico; y
- R es, cada vez que aparece, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C₁-C₁₂; y
- 35 R¹² es, cada vez que aparece, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴R¹⁵, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, oxo, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcar-bonil guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi C₁-C₁₂, donde R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, cada vez que aparecen, independientemente alquilo C₁-C₁₂; y donde al menos uno de los enlaces entre subunidades es el enlace (B).
- 40 En algunas realizaciones de la estructura anterior, al menos el 5% de los enlaces entre subunidades son enlaces (B). En una realización relacionada, del 10 % al 50 % de los enlaces entre subunidades son enlaces (B). En otra realización relacionada, cada enlace (B) tiene la misma estructura en cada aparición. En otra realización específica más de la estructura anterior, cada Y y cada W son O.
- 45 Otras realizaciones de la invención proporcionan un oligonucleótido antisentido que comprende un esqueleto, comprendiendo el esqueleto una secuencia de estructuras de anillo de morfolino unidas por enlaces entre subunidades de tipo (A), (B), o combinaciones de los mismos, en donde cada estructura de anillo de morfolino soporta una base - resto

de emparejamiento, de modo que el compuesto oligonucleotídico pueda unirse de una manera específica de secuencia a un ácido nucleico objetivo, que comprende una secuencia objetivo que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 4 u 11, y donde el oligonucleótido comprende un extremo 3', un extremo 5' y tiene la siguiente estructura (XVII):



(XVII)

5

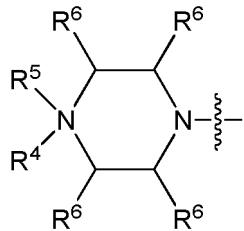
o una de sus sales o isómeros, y

donde para el enlace (A):

10

W es, cada vez que aparece, independientemente S u O;

X es, cada vez que aparece, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o ;



(II)

15

Y es, cada vez que aparece, independientemente O o $-NR^2$,

R1 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo;

R2 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o $-LNR^4R^5R^7$; R3 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C1-C6;

20

R4 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, metilo, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ o

$-[C(O)CHR'NH]_mH$, donde Z es carbonilo (C(O)) o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;

R5 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;

R6 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo;

25

R7 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno alquilo C1-C6 o alcoxialquilo C1-C6;

L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos; y

donde para el enlace (B):

5

W es, cada vez que aparece, independientemente S u O;

X es, cada vez que aparece, independientemente -NR⁸R⁹ o -OR³; e

Y es, cada vez que aparece, independientemente O o -NR¹⁰,

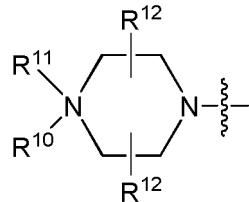
R⁸ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂;

10 R⁹ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo;

R¹⁰ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o -LNR⁴R⁵R⁷;

donde R⁸ y R⁹ pueden unirse para formar un heterociclo mono o bicíclico de 5-18 miembros o R⁸, R⁹ o R³ pueden unirse con R¹⁰ para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y donde cuando X es 4-piperazino, X tiene la siguiente estructura (III):

15



(III)

donde:

20

R¹⁰ es, cada vez que aparece, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclico; y

R¹¹ es, cada vez que aparece, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C₁-C₁₂;

25 R¹² es, cada vez que aparece, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴R¹⁵, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonilo, guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi C₁-C₁₂, donde R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, cada vez que aparecen, independientemente alquilo C₁-C₁₂; y R¹⁷ está, cada vez que aparece, independientemente ausente, hidrógeno o alquilo C₁-C₆;

R¹⁸ y R¹⁹ son, en cada caso, independientemente ausentes, hidrógeno, un péptido de penetración celular, un aminoácido natural o no natural, alquilcarbonilo C₂-C₃₀, -C(=O)OR²¹ o R²⁰;

30

R²⁰ es, cada vez que aparece, independientemente guanidinilo, heterociclico, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilaquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, ariloxicarbonilo C₈-C₃₀ aralquiloxicarbonilo, o -P(=O)(R²²)₂;

35

R²¹ es alquilo C₁-C₃₀ que comprende uno o más restos de oxígeno o hidroxilo o combinaciones de los mismos; cada R²² es independientemente ariloxi C⁶-C¹²;

B es un resto de apareamiento de bases;

L¹ es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende enlaces seleccionados de alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, amida, éster, carbonilo, carbamato, fosforodiamidato, fosforoamidato, fosforotioato, piperazina y fosfodiéster;

40

x es un número entero de 0 o mayor; y

donde al menos uno de R¹⁸ o R¹⁹ es R²⁰ y siempre que R¹⁷ y R¹⁸ no estén ausentes.

Estos y otros aspectos de la invención serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada. Con este fin, se establecen varias referencias en el presente documento que describen con más detalle ciertos antecedentes, procedimientos, compuestos y/o composiciones.

45

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1A muestra una estructura de oligómero de morfolino ejemplar con un enlace fosforodiamidato;

50

La Figura 1B muestra un oligómero de morfolino como en la Figura 1A, pero donde los enlaces de la columna vertebral contienen un grupo cargado positivamente en forma de un enlace de (piperazino) fosforodiamidato;

La Figura 1C muestra un conjugado de un péptido rico en arginina y un oligómero antisentido, de acuerdo con una realización de la invención;

55

Las Figuras 1D-G muestran el segmento de subunidad de repetición de oligonucleótidos de morfolino ejemplares, designados de D a G.

La figura 2 muestra los resultados del cribado por inmunofluorescencia de progerina y lámina A/C.

La Figura 3 muestra los resultados del análisis Western de lámina A y progerina.

La Figura 4 muestra los resultados del análisis RT-qPCR de lámina A y progerina.

La figura 5 muestra los resultados del análisis Western de lámina A, lámina C y progerina.

Descripción detallada

5

La presente invención se refiere a oligonucleótidos para su uso en la modulación del empalme aberrante de un pre-ARNm de LMNA humano y una composición que contiene el mismo. También se describen en este documento métodos in vitro, donde los oligonucleótidos inhiben la expresión del ARNm de la proteína LMNA mutante, por ejemplo, mediante la modulación del empalme del pre-ARNm de LMNA.

10

Definiciones

15

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que comúnmente entienden los expertos en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en este documento puede usarse en la práctica o prueba de la presente invención, se describen métodos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

20

Los artículos "un" y "una" se utilizan aquí para referirse a uno o más de uno (esto es, a por lo menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía tanto como 30, 25, 20, 25, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1% a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

25

Por "secuencia codificante" se entiende cualquier secuencia de ácido nucleico que contribuya al código del producto polipeptídico de un gen. Por el contrario, el término "secuencia no codificante" se refiere a cualquier secuencia de ácido nucleico que no contribuya al código del producto polipeptídico de un gen.

30

A lo largo de esta especificación, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que las palabras "comprende", "comprenden" y "que comprende" implican la inclusión de un paso o elemento o grupo de pasos o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otro. paso o elemento o grupo de pasos o elementos.

35

Por "que consiste en" se entiende que incluye, y se limita a, todo lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consta de" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes. Por "que consiste esencialmente en" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren ni contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan materialmente o no la actividad o acción de los elementos enumerados.

40

Los términos "complementario" y "complementariedad" se refieren a polinucleótidos (esto es, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de apareamiento de bases. Por ejemplo, la secuencia "A-G-T" es complementaria a la secuencia "T-C-A". La complementariedad puede ser "parcial", donde solo algunas de las bases de los ácidos nucleicos se emparejan de acuerdo con las reglas de emparejamiento de bases. O puede haber una complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácidos nucleicos tiene efectos significativos sobre la eficacia y la fuerza de la hibridación entre las cadenas de ácidos nucleicos. Si bien a menudo se desea una complementariedad perfecta, algunas realizaciones pueden incluir uno o más, pero preferiblemente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 desajustes con respecto al ARN objetivo. Se incluyen variaciones en cualquier ubicación dentro del oligómero. En ciertas realizaciones, las variaciones en la secuencia cerca de los extremos de un oligómero son generalmente preferibles a las variaciones en el interior y, si están presentes, normalmente están dentro de aproximadamente 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nucleótidos del 5' y/o 3' terminal.

45

Los términos "péptido de penetración celular" o "CPP, por sus siglas en inglés" se usan indistintamente y se refieren a péptidos catiónicos de penetración celular, también denominados péptidos de transporte, péptidos portadores o dominios de transducción de péptidos. Los péptidos, como se muestra aquí, tienen la capacidad de inducir la penetración celular dentro del 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de las células de una población de cultivo celular determinada, incluidas todas enteros intermedios, y permiten la translocación macromolecular dentro de múltiples tejidos *in vivo* tras la administración sistémica.

50

Los términos "oligómero antisentido" o "compuesto antisentido" u "oligonucleótido antisentido" u "oligonucleótido" se usan indistintamente y se refieren a una secuencia de subunidades cíclicas, cada una con un resto de apareamiento de bases, unidas por enlaces entre subunidades que permiten el apareamiento de bases, restos para hibridar con una secuencia objetivo en un ácido nucleico (típicamente un ARN) mediante emparejamiento de bases de Watson-Crick, para formar un heterodúplex de ácido nucleico:oligómero dentro de la secuencia objetivo. Las subunidades cíclicas se basan en un grupo morfolino (consulte la descripción de los oligómeros de morfolino a continuación).

Un oligómero antisentido de este tipo puede diseñarse para bloquear o inhibir la traducción de ARNm o para inhibir el procesamiento natural de empalme de pre-ARNm, o inducir la degradación de ARNm objetivo, y puede decirse que está "dirigido a" o "dirigido contra" una secuencia objetivo con que hibrida. En ciertas realizaciones, la secuencia objetivo es una región que rodea o incluye un codón de inicio AUG de un ARNm, un sitio de empalme 3' o 5' de un ARNm preprocesado o un punto de ramificación. La secuencia objetivo puede estar dentro de un exón o dentro de un intrón o una combinación. La secuencia objetivo para un sitio de empalme puede incluir una secuencia de ARNm que tiene su extremo 5' de 1 a aproximadamente 25 pares de bases corriente abajo de una unión aceptora de empalme normal en un ARNm preprocesado. Una secuencia objetivo preferida para un empalme es cualquier región de un ARNm preprocesado que incluye un sitio de empalme o está contenido completamente dentro de una secuencia codificante de exón o abarca un sitio donante o aceptor de empalme. Se dice más generalmente que un oligómero está "dirigido contra" un objetivo biológicamente relevante tal como, en la presente invención, un pre-ARNm del gen LMNA humano que codifica la proteína lámina A, cuando está dirigido contra el ácido nucleico del objetivo en la manera descrita anteriormente. Las secuencias de direccionamiento ejemplares incluyen SEQ ID NOS: 3-34.

15 Se incluyen oligonucleótidos antisentido que comprenden cualquiera de las SEQ ID NO: 4 u 11.

Los términos "oligómero de morfolino" u "PMO" (oligómero de morfolino de fosforamidato o fosforodiamidato, por sus siglas en inglés) se refieren a un análogo de oligonucleótido compuesto por estructuras de subunidades de morfolino, donde (i) las estructuras están unidas entre sí por enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de largo, preferiblemente de dos átomos de largo, y preferiblemente sin carga o catiónico, uniendo el nitrógeno de morfolino de una subunidad a un carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente, y (ii) cada anillo de morfolino lleva una purina o pirimidina o un resto de apareamiento de bases equivalente efectivo para se unen, mediante enlaces de hidrógeno específicos de base, a una base en un polinucleótido. Se pueden hacer variaciones a este enlace siempre que no interfieran con el enlace o la actividad. Por ejemplo, el oxígeno unido al fósforo puede sustituirse por azufre (tiofosforodiamidato). El oxígeno 5' puede estar sustituido con amino o amino sustituido con alquilo inferior. El nitrógeno colgante unido al fósforo puede estar sin sustituir, monosustituido o disustituido con alquilo inferior (opcionalmente sustituido). Véase también la discusión de los enlaces catiónicos a continuación. El resto de apareamiento de bases de purina o pirimidina es típicamente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. La síntesis, las estructuras y las características de unión de los oligómeros de morfolino se detallan en las patentes estadounidenses números 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063 y 5.506.337 y las aplicaciones PCT Nos. PCT/US07/11435 (enlaces catiónicos) y US08/012804 (síntesis mejorada).

"PMO+" se refiere a oligómeros de fosforodiamidato-morfolino que comprenden cualquier número de enlaces (1-piperazino)fosfinilidenooxi, (1-(4-(ω -guanidino-alcanoil))-piperazino)fosfinilidenooxi (A2 y A3) que se han determinado. 35 escrito anteriormente (ver por ejemplo, publicación PCT WO/2008/036127).

"PMO-X" se refiere a oligómeros de fosforodiamidato-morfolino descritos en el presente documento que comprenden al menos un enlace (B) o al menos una de las modificaciones terminales descritas, y como se describe en los documentos WO2011/150408 y US2012/0065169. Se pueden encontrar otros oligómeros de fosforodiamidato-morfolino PMO-X útiles 40 aquí en la Solicitud Provisional de EE. UU. No. 61/561,806, presentada el 18 de noviembre de 2011.

Un grupo "fosforamidato" comprende fósforo que tiene tres átomos de oxígeno unidos y un átomo de nitrógeno unido, mientras que un grupo "fosforodiamidato" comprende fósforo que tiene dos átomos de oxígeno unidos y dos átomos de nitrógeno unidos. En los enlaces entre subunidades no cargados o modificados de los oligómeros descritos en el presente 45 documento y en las solicitudes de patente de EE.UU. en tramitación junto con la presente números 61/349.783 y 11/801.885, un nitrógeno siempre cuelga de la cadena principal. El segundo nitrógeno, en un enlace fosforodiamidato, es típicamente el nitrógeno del anillo en una estructura de anillo de morfolino.

Los enlaces "tiofosforamidato" o "tiofosforodiamidato" son enlaces fosforamidato o fosforodiamidato, respectivamente, 50 donde un átomo de oxígeno, típicamente el oxígeno pendiente de la columna vertebral, se reemplaza con azufre.

"Enlace entre subunidades" se refiere al enlace que conecta dos subunidades de morfolino, por ejemplo, la estructura (I).

"Cargado", "descargado", "catiónico" y "aniónico", como se usa aquí, se refiere al estado predominante de un resto químico 55 a un pH casi neutro, por ejemplo, de aproximadamente 6 a 8. Por ejemplo, el término puede referirse al estado predominante del resto químico a pH fisiológico, es decir, alrededor de 7,4.

El término "análogo de oligonucleótido" se refiere a un oligonucleótido que tiene (i) una estructura de cadena principal modificada, por ejemplo, una columna vertebral distinta del enlace fosfodiéster estándar que se encuentra en los oligonucleótidos y polinucleótidos naturales, y (ii) opcionalmente, restos de azúcar modificados, por ejemplo, restos de morfolino en lugar de restos de ribosa o desoxirribosa. Los análogos de oligonucleótidos soportan bases capaces de formar enlaces de hidrógeno mediante el emparejamiento de bases de Watson-Crick con bases polinucleotídicas 60 estándar, donde el esqueleto del análogo presenta las bases de una manera que permite dicho enlace de hidrógeno de una manera específica de secuencia entre la molécula del análogo de oligonucleótido y las bases en un estándar. polinucleótido (por ejemplo, ARN monocatenario o ADN monocatenario). Los análogos preferidos son aquellos que tienen 65 un esqueleto que contiene fósforo sustancialmente sin carga.

- Una columna vertebral que contiene fósforo sustancialmente sin carga en un análogo de oligonucleótido es aquella donde la mayoría de los enlaces de subunidades, *por ejemplo*, entre 50-100%, típicamente al menos 60% a 100% o 75% u 80% de sus enlaces, no están cargados y contienen un solo átomo de fósforo. Los oligonucleótidos antisentido y los análogos de oligonucleótidos pueden contener entre alrededor de 8 y 40 subunidades, típicamente alrededor de 8-25 subunidades, y preferiblemente alrededor de 12 a 25 subunidades (incluyendo todos los números enteros y rangos intermedios). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos pueden tener una complementariedad de secuencia exacta con la secuencia objetivo o una complementariedad cercana, como se define a continuación.
- Una "subunidad" de un oligonucleótido se refiere a una unidad de nucleótido (o análogo de nucleótido). El término puede referirse a la unidad de nucleótidos con o sin el enlace intersubunitario adjunto, aunque, cuando se hace referencia a una "subunidad cargada", la carga normalmente reside dentro del enlace intersubunitario (*por ejemplo*, un enlace fosfato o fosforotioato o un enlace catiónico).
- El resto de apareamiento de bases de purina o pirimidina es típicamente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. También se incluyen bases como piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trime115toxicobenceno, 3-metiluracilo, dihidouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidinas (*por ejemplo*, 5-metilcitidina), 5-alquiluridinas (*por ejemplo*, ri-botimidina), 5-halouridina (*por ejemplo*, 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (*por ejemplo* 6-metiluridina), propino, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wybutsosina, wybutoxosina, 4-acetiltidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, β -D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonimeturidina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, β -D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético, 2-tiocitidina, derivados de treonina y otros (Burgin y col., 1996, Biochemistry, 35, 14090; Uhlman & Peyman, supra). Por "bases modificadas" en este aspecto se entiende bases de nucleótidos distintas de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), como se ilustró anteriormente; tales bases pueden usarse en cualquier posición en la molécula antisentido. Los expertos en la materia apreciarán que dependiendo de los usos de los oligómeros, Ts y Us son intercambiables. Por ejemplo, con otras químicas antisentido como los oligonucleótidos antisentido 2'-O-metil que son más similares al ARN, las bases T pueden mostrarse como U (ver, *por ejemplo*, Listado de secuencias).
- Una "subunidad de aminoácido" o "residuo de aminoácido" puede referirse a un residuo de aminoácido α (-CO-CHR-NH-) o a un residuo de aminoácido β - u otro (*por ejemplo*, -CO-(CH₂)_nCHR-NH-), donde R es una cadena lateral (que puede incluir hidrógeno) y n es de 1 a 7, preferiblemente de 1 a 4.
- El término "aminoácido natural" se refiere a un aminoácido presente en proteínas que se encuentran en la naturaleza, como los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otros como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina. El término "aminoácidos no naturales" se refiere a aquellos aminoácidos que no están presentes en las proteínas que se encuentran en la naturaleza, los ejemplos incluyen beta-alanina (β -Ala), ácido 6-aminohexanoico (Ahx) y ácido 6-aminopentanoico. Ejemplos adicionales de "aminoácidos no naturales" incluyen, sin limitación, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que son conocidos por un experto en la técnica.
- Por "aislado" se entiende material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un "polinucleótido aislado" u "oligonucleótido aislado", como se usa en el presente documento, puede referirse a un polinucleótido que ha sido purificado o eliminado de las secuencias que lo flanquean en un estado natural. *por ejemplo*, un fragmento de ADN que se ha eliminado de las secuencias que normalmente son adyacentes al fragmento.
- Una "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de oligómero antisentido eficaz para modular la expresión de progerina *in vitro*.
- Por "mejorar" o "mejorando", o "aumentar" o "aumentando", o "estimular" o "estimulando", se refiere generalmente a la capacidad de uno o compuestos o composiciones antisentido para producir o causar una mayor respuesta fisiológica (*es decir*, efectos corriente abajo) en una célula, en comparación con la respuesta causada por un compuesto de control o sin compuesto antisentido. Una cantidad "aumentada" o "mejorada" suele ser una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un aumento de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50 o más veces (*por ejemplo*, 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y puntos decimales entre y por encima de 1), *por ejemplo*, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por ningún compuesto antisentido (la ausencia de un agente) o un compuesto de control.
- El término "reducir" o "inhibir" puede relacionarse generalmente con la capacidad de uno o más compuestos antisentido para usar en la invención para "disminuir" una respuesta fisiológica o celular relevante, medida según técnicas de rutina en el campo del diagnóstico. Respuestas fisiológicas o celulares relevantes (*in vivo* o *in vitro*) será evidente para los expertos en la técnica y puede incluir, por ejemplo, reducciones en la expresión de progerina medida por los niveles de ARNm y/o proteína. Una "disminución" en una respuesta puede ser "estadísticamente significativa" en comparación con la respuesta producida por un compuesto sin sentido o una composición de control, y puede incluir un 1%, 2%, 3%, 4%,

5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de disminución, incluidos todos los enteros intermedios.

5 El término "secuencia objetivo" se refiere a una parte del ARN objetivo contra el que se dirige el oligonucleótido o el agente antisentido, es decir, la secuencia con la que se hibridará el oligonucleótido mediante el apareamiento de bases de Watson-Crick de una secuencia complementaria. En ciertas realizaciones, la secuencia objetivo puede ser una región contigua de un pre-ARNm que incluye la secuencia objetivo tanto del intrón como del exón. En ciertas otras realizaciones, la secuencia objetivo consistirá exclusivamente en secuencias de intrones o exones.

10 15 El término "secuencia de direccionamiento" o "secuencia de direccionamiento antisentido" se refiere a la secuencia en un oligonucleótido u otro agente antisentido que es complementario (es decir, además, sustancialmente complementario) a la secuencia objetivo en el genoma de ARN. La secuencia completa, o solo una parte, del compuesto antisentido puede ser complementaria a la secuencia objetivo. Por ejemplo, en un oligonucleótido que tiene de 20 a 30 bases, aproximadamente 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29 pueden ser secuencias dirigidas que son complementarias a la región objetivo. Por lo general, la secuencia de direccionamiento está formada por bases contiguas, pero alternativamente puede estar formada por secuencias no contiguas que, cuando se colocan juntas, *por ejemplo*, desde los extremos opuestos del oligonucleótido, constituyen la secuencia que abarca la secuencia objetivo.

20 25 30 35 Las secuencias objetivo y de direccionamiento se describen como "complementarias" entre sí cuando la hibridación se produce en una configuración antiparalela. Una secuencia de direccionamiento puede tener una complementariedad "casi" o "sustancial" con la secuencia objetivo y seguir funcionando para el propósito de la presente invención, es decir, todavía puede ser funcionalmente "complementaria". En ciertas realizaciones, un oligonucleótido puede tener como máximo un desajuste con la secuencia objetivo de 10 nucleótidos, y preferiblemente como máximo un desajuste de 20. Alternativamente, un oligonucleótido puede tener al menos un 90% de homología de secuencia, y preferiblemente al menos un 95% de homología de secuencia, con las secuencias de direccionamiento antisentido ejemplares descritas en el presente documento.

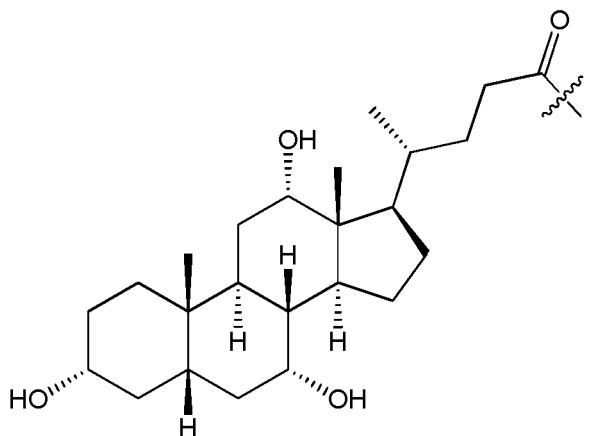
30 35 Un oligonucleótido "híbrida específicamente" con un polinucleótido objetivo si el oligómero hibrida con el objetivo en condiciones fisiológicas, con una Tm sustancialmente superior a 45 °C, preferentemente al menos 50 °C, y normalmente de 60 °C a 80 °C o superior. Tal hibridación corresponde preferiblemente a condiciones de hibridación estrictas. A una fuerza iónica y un pH determinados, la Tm es la temperatura a la que el 50% de una secuencia objetivo se hibrida con un polinucleótido complementario. Nuevamente, dicha hibridación puede ocurrir con una complementariedad "casi" o "sustancial" del oligómero antisentido con la secuencia objetivo, así como con una complementariedad exacta.

40 "Homología" se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología puede determinarse usando programas de comparación de secuencias como GAP (Deveraux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12, 387-395). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en este documento podrían compararse mediante la inserción de espacios en la alineación, siendo determinados dichos espacios, por ejemplo, por el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

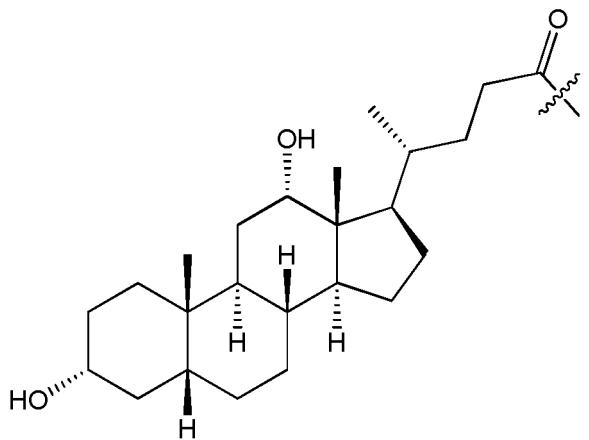
45 50 Los términos "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprende una "secuencia 50% idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas en una base de nucleótido por nucleótido o de aminoácido por aminoácido, base sobre una ventana de comparación. Por lo tanto, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias alineadas de forma óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones donde la base de ácido nucleico idéntica (*por ejemplo*, A, T, C, G, I) o el residuo de aminoácido idéntico (*por ejemplo*, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) ocurre en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (esto es, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

55 60 65 Los términos utilizados para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 8 o 10 pero frecuentemente de 15 a 18 ya menudo al menos 25 unidades monoméricas, incluidos los nucleótidos y los residuos de aminoácidos. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia de polinucleótidos completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente de 50 a 100, más generalmente de 100 a 150, donde una secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de las dos secuencias están óptimamente alineadas. La ventana de comparación puede incluir adiciones o eliminaciones (es decir, lagunas) de aproximadamente el 20% o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para una alineación óptima de las dos secuencias.

- 5 El alineamiento óptimo de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o por inspección y la mejor alineación (esto es, dando como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como, por ejemplo, divulgada por Altschul et al., 1997, Nucl. Ácidos Res. 25:3389. Se puede encontrar una discusión detallada del análisis de secuencias en la Unidad 19.3 de Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.
- 10 15 Una molécula oligomérica "resistente a nucleasas" (oligómero) se refiere a una cuyo esqueleto es sustancialmente resistente a la escisión por nucleasas, en forma no hibridada o hibridada; por nucleasas extracelulares e intracelulares comunes en el cuerpo; es decir, el oligómero muestra poca o ninguna escisión por nucleasa en condiciones normales de nucleasa en el cuerpo al que se expone el oligómero.
- 20 25 Un agente es "captado activamente por células de mamífero" cuando el agente puede entrar en la célula por un mecanismo distinto a la difusión pasiva a través de la membrana celular. El agente puede ser transportado, por ejemplo, por "transporte activo", refiriéndose al transporte de agentes a través de una membrana celular de mamífero *por ejemplo*, un mecanismo de transporte dependiente de ATP, o por "transporte facilitado", que se refiere al transporte de agentes antisentido a través de la membrana celular mediante un mecanismo de transporte que requiere la unión del agente a una proteína de transporte, que luego facilita el paso del agente unido a través de la membrana celular. Tanto para el transporte activo como para el facilitado, los análogos de oligonucleótidos tienen preferiblemente un esqueleto sustancialmente sin carga, como se define a continuación.
- 30 35 40 45 50 55 Un "heterodúplex" se refiere a un dúplex entre un oligonucleótido antisentido y la porción complementaria de un ARN objetivo. Un "heterodúplex resistente a nucleasas" se refiere a un heterodúplex formado por la unión de un oligómero antisentido a su objetivo complementario, de modo que el heterodúplex es sustancialmente resistente a la degradación *in vivo* por nucleasas intracelulares y extracelulares, como ARNasaH, que son capaces de cortar complejos de doble cadena ARN/ARN o ARN/ADN.
- Como se usa aquí, el término "fluido corporal" abarca una variedad de tipos de muestras obtenidas de un sujeto que incluyen orina, saliva, plasma, sangre, líquido cefalorraquídeo u otra muestra de origen biológico, como células de la piel o desechos dérmicos, y puede referirse a células o fragmentos de células suspendidos en ellas, o al medio líquido y sus solutos.
- El término "cantidad relativa" se usa cuando se hace una comparación entre una medición de prueba y una medición de control. La cantidad relativa de un reactivo que forma un complejo en una reacción es la cantidad que reacciona con una muestra de prueba, en comparación con la cantidad que reacciona con una muestra de control. La muestra de control se puede procesar por separado en el mismo ensayo o puede ser parte de la misma muestra (por ejemplo, tejido normal que rodea un área maligna en una sección de tejido).
- Un gen o producto génico de tipo silvestre es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se designa arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen.
- Los siguientes términos químicos tienen los siguientes significados, a menos que se indique lo contrario:
- "Amino" se refiere al radical $-NH_2$.
 "Ciano" o "nitrilo" se refiere al radical $-CN$.
 "Hidroxí" o "hidroxilo" se refiere al radical $-OH$.
 "Imino" se refiere al sustituyente $=NH$.
 "Guanidinilo" se refiere al sustituyente $-NHC(=NH)NH_2$.
 "Amidinilo" se refiere al sustituyente $-C(=NH)NH_2$.
 "Nitro" se refiere al radical $-NO_2$.
 "Oxo" se refiere al sustituyente $=O$.
 "Tioxo" se refiere al sustituyente $=S$.
 "Colato" se refiere a la siguiente estructura:



"Desoxicoloate" se refiere a la siguiente estructura:



5

- "Alquilo" se refiere a un radical de cadena hidrocarbonada lineal o ramificada que está saturada o insaturada (*es decir*, contiene uno o más enlaces dobles y/o triples), que tiene de uno a treinta átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace simple. Se incluyen los alquilos que comprenden cualquier número de átomos de carbono de 1 a 30. Un alquilo que comprende hasta 30 átomos de carbono se denomina alquilo C₁-C₃₀, asimismo, por ejemplo, un alquilo que comprende hasta 12 átomos de carbono es un alquilo C₁-C₁₂. Los alquilos (y otros restos definidos aquí) que comprenden otros números de átomos de carbono se representan de manera similar. Los grupos alquilo incluyen, entre otros, alquilo C₁-C₃₀, alquilo C₁-C₂₀, alquilo C₁-C₁₅, alquilo C₁-C₁₀, alquilo C₁-C₈, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₄, alquilo C₁-C₃, alquilo C₁-C₂, alquilo C₂-C₈, alquilo C₃-C₈ y alquilo C₄-C₈. Los grupos alquilo representativos incluyen, entre otros, metilo, etilo, *n*-propil, 1-metiletilo (*iso*-propilo), *n*-butilo, *i*-butilo, *s*-butilo, *n*-pentilo, 1,1-dimetiletilo (*t*-butilo), 3-metilhexilo, 2-metilhexilo, etenilo, prop-1-enilo, but-1-enilo, pent-1-enilo, penta-1,4-dienilo, etinilo, propinilo, but-2-inilo, but-3-inilo, pentinilo, hexinilo y similares. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo alquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 10 "Alquileno" o "cadena de alquileno" se refiere a una cadena hidrocarbonada divalente lineal o ramificada que une el resto de la molécula a un grupo radical. Los alquilenos pueden ser saturados o insaturados (*es decir*, contiene uno o más enlaces dobles y/o triples). Los alquilenos representativos incluyen, pero no se limitan a, alquileno C₁-C₁₂, alquileno C₁-C₈, alquileno C₁-C₆, alquileno C₁-C₄, alquileno C₁-C₃, alquileno C₁-C₂, alquileno C₁. Los grupos alquileno representativos incluyen, pero no se limitan a, metileno, etileno, propileno, *n*-butileno, etenileno, propenileno, *n*-butenileno, propinileno, *n*-butinileno, y similares. La cadena de alquileno está unida al resto de la molécula a través de un enlace simple o doble y al grupo radical a través de un enlace simple o doble. Los puntos de unión de la cadena de alquileno al resto de la molécula y al grupo radical pueden ser a través de un carbono o dos carbonos dentro de la cadena. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, una cadena de alquileno puede estar opcionalmente sustituida como se describe a continuación.
- 15 20 "Alcoxi" se refiere a un radical de fórmula -OR_a donde R_a es un radical alquilo como se define. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo alcoxi puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 25 30 "Alcoxialquilo" se refiere a un radical de fórmula -R_bOR_a donde R_a es un radical alquilo como se define y donde R_b es un radical alquileno como se define. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo alcoxialquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 35

- 5 "Alquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_a$ donde R_a es un radical alquilo como se ha definido anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo alquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 10 "Alquiloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_a$ donde R_a es un radical alquilo como se define. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo alquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 15 "Alquilamino" se refiere a un radical de fórmula $-NHR_a$ o $-NR_aR_a$ donde cada R_a es, independientemente, un radical alquilo como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo alquilamino puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 20 "Amidilo" se refiere a un radical de fórmula $-N(H)C(=O)R_a$ donde R_a es un radical alquilo o arilo como se define en el presente documento. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo amidilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 25 "Amidinilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_b-C(=NH)NH_2$ donde R_b es un radical alquíleno como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo amidinilalquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 30 "Aminoalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_b-NR_aR_a$ donde R_b es un radical alquíleno como se define anteriormente, y cada R_a es independientemente un hidrógeno o un radical alquilo.
- 35 "Tioalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-SR_a$ donde R_a es un radical alquilo como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo tioalquilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 40 "Arilo" se refiere a un radical derivado de un sistema de anillo hidrocarbonado que comprende hidrógeno, de 6 a 30 átomos de carbono y al menos un anillo aromático. El radical arilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillos fusionados o con puente. Los radicales arilo incluyen, pero no se limitan a, radicales arilo derivados de los sistemas de anillos hidrocarbonados de aceantríleno, acenaftíleno, acefanantríleno, antraceno, azuleno, benceno, criseno, fluoranteno, fluoreno, *as*-indaceno, *s*-indaceno, indano, indeno, naftaleno, fenaleno, fenantreno, pleyadeno, pireno y trifenileno. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el término "arilo" o el prefijo "ar-" (como en "aralquilo") pretende incluir radicales arilo que están opcionalmente sustituidos.
- 45 "Aralquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_b-R_c$ donde R_b es una cadena de alquíleno como se define anteriormente y R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, bencilo, difenilmetilo, tritilo y similares. A menos que se diga lo contrario específicamente en la especificación, un grupo aralquilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 50 "Arilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_c$ donde R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo arilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 55 "Ariloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_c$ donde R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo ariloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 60 "Aralquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_b-R_c$ donde R_b es una cadena de alquíleno como se define anteriormente y R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo aralquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 65 "Aralquiloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_b-R_c$ donde R_b es una cadena de alquíleno como se define anteriormente y R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo aralquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- "Ariloxi" se refiere a un radical de fórmula $-OR_c$ donde R_c es uno o más radicales arilo como se define anteriormente, por ejemplo, fenilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo arilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.

- 5 "Cicloalquilo" se refiere a un anillo carbocíclico monocíclico o policíclico, no aromático, estable, que puede incluir sistemas de anillos fusionados o puenteados, que está saturado o insaturado, y unido al resto de la molécula mediante un enlace simple. Los cicloalquilos representativos incluyen, pero no se limitan a, cicloalquilos que tienen de tres a quince átomos de carbono y de tres a ocho átomos de carbono. Los radicales cicloalquilo monocíclicos incluyen, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo. Los radicales policíclicos incluyen, por ejemplo, adamantilo, norbornilo, decalinilo y 7,7-dimetil-biciclo[2.2.1]heptanilo. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 10 "Cicloalquilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_bR_d$ donde R_b es una cadena de alquieno como se define anteriormente y R_d es un radical cicloalquilo como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquilalquilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 15 15 "Cicloalquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_d$ donde R_d es un radical cicloalquilo como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 20 20 "Cicloalquiloxicarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)OR_d$ donde R_d es un radical cicloalquilo como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo cicloalquiloxicarbonilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 25 "Fusionado" se refiere a cualquier estructura de anillo descrita en el presente documento que está fusionada con una estructura de anillo existente. Cuando el anillo fusionado es un anillo de heterociclico o un anillo de heteroarilo, cualquier átomo de carbono en la estructura del anillo existente que se convierte en parte del anillo de heterociclico fusionado o del anillo de heteroarilo fusionado puede reemplazarse con un átomo de nitrógeno.
- 30 30 "Guanidinilalquilo" se refiere a un radical de fórmula $-R_b-NHC(=NH)NH_2$ donde R_b es un radical alquieno como se define anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo guanidinilalquilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 35 "Guanidinilalquilcarbonilo" se refiere a un radical de fórmula $-C(=O)R_b-NHC(=NH)NH_2$ donde R_b es un alquieno radical como se definió anteriormente. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo guanidinilalquilcarbonilo puede estar opcionalmente sustituido como se describe a continuación.
- 40 40 "Halo" o "halógeno" se refiere a bromo, cloro, flúor o yodo.
- 45 "Haloalquilo" se refiere a un radical alquilo, como se define anteriormente, que está sustituido con uno o más radicales halo, como se define anteriormente, por ejemplo, trifluorometilo, difluorometilo, fluorometilo, triclorometilo, 2,2,2-trifluoroetilo, 1,2-difluoroetilo, 3-bromo-2-fluoropropilo, 1,2-dibromoetilo y similares. A menos que se indique específicamente lo contrario en la especificación, un grupo haloalquilo puede estar opcionalmente sustituido.
- 50 50 "Perhalo" o "perfluoro" se refiere a un resto donde cada átomo de hidrógeno ha sido reemplazado por un átomo de halo o un átomo de flúor, respectivamente.
- 55 55 "Heterociclico" o "anillo heterocíclico" se refiere a un radical anular no aromático estable de 3 a 24 miembros que comprende de 2 a 23 átomos de carbono y de uno a 8 heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, el radical heterociclico puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillos fusionados o con puente; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heterociclico pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado; y el radical heterociclico puede estar parcial o totalmente saturado. Los ejemplos de tales radicales heterociclico incluyen, pero no se limitan a, dioxolanilo, tienil[1,3]ditianilo, decahidroisoquinolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, isotiazolidinilo, isoxazolidinilo, morfolinilo, octahidroindolilo, octahidroisoindolilo, 2-oxopiperazinilo, 2-oxopiperidinilo, 2-oxopirrolidinilo, oxazolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, 4-piperidinilo, pirrolidinilo, pirazolidinilo, quinuclidinilo, tiazolidinilo, tetrahidrofurilo, tritianilo, tetrahidropiranilo, tiomorfolinilo, tiamorfolinilo, 1-oxo-tiomorfolinilo, 1,1-dioxo-tiomorfolinilo, 1,1-dioxo-tiomorfolinilo, -corona-4, 15-corona-5, 18-corona-6, 21-corona-7, aza-18-corona-6, diaza-18-corona-6, aza-21-corona-7, y diaza-21-corona-7. A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo heterociclico puede estar opcionalmente sustituido.
- 60 60 "Heteroarilo" se refiere a un radical de sistema de anillo de 5 a 14 miembros que comprende átomos de hidrógeno, uno a trece átomos de carbono, uno a seis heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en nitrógeno, oxígeno, fósforo y azufre, y al menos un anillo aromático. Para los fines de esta invención, el radical heteroarilo puede ser un sistema de anillo monocíclico, bicíclico, tricíclico o tetracíclico, que puede incluir sistemas de anillos fusionados o con puente; y los átomos de nitrógeno, carbono o azufre en el radical heteroarilo pueden estar opcionalmente oxidados; el átomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. Los ejemplos incluyen, entre otros, azepinilo, acridinilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, bencindolilo, benzodioxolilo, benzofuranilo, benzooxazolilo, benzotiazolilo,

5 benzotiadiazolilo, benzo[b][1,4]dioxepinilo, 1,4-benzodioxanilo, benzoaftofura- nilo, benzoxazolilo, benzodioxolilo, benzodioxinilo, benzopiranilo, benzopiranonilo, benzofuranilo, benzofuranonilo, benzotienilo (benzotiofenilo), benzotriazolilo, benzo[4,6]imidazo[1,2-a]piridinilo, carbazolilo, cinnolinilo, dibenzofuranilo, dibenzotiofenilo, furanilo, furanonilo, isotiazolilo, imidazolilo, indazolilo, indolilo, indazolilo, isoindolilo, indolinilo, isoquinolilo, indolizinilo, isoxazolilo, naftiridinilo, oxadiazolilo, 2-oxoazepinilo, oxazolilo, oxiranilo, 1-oxidopiridinilo, 1-oxidopirimidinilo, 1-oxidopirazinilo, 1-oxidopiridazinilo, 1-fenil-1H-pirrolilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, ftalazinilo, pteridinilo, purinilo, pirrolilo, pirazolilo, piridinilo, pirazinilo, pirimidinilo, piridazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, quinolinilo, quinuclidinilo, isoquinolinilo, tetrahidroquinolinilo, tiazolilo, tiadiazolilo, triazolilo, y, tiofenilo (esto es, tienilo). A menos que se indique específicamente lo contrario en la memoria descriptiva, un grupo heteroarilo puede estar opcionalmente sustituido.

10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60

Todos los grupos anteriores pueden estar sustituidos o no sustituidos. El término "sustituido" como se usa aquí significa cualquiera de los grupos anteriores (esto es, alquilo, alquieno, alcoxi, alcoxialquilo, alquilcarbonilo, alquiloxicarbonilo, alquilamino, amidilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonilo, aminoalquilo, arilo, aralquilo, arilcarbonilo, ariloxicarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquiloxicarbonilo, ariloxi, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilcarbonilo, cicloalquilalquilcarbonilo, cicloalquiloxicarbonilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, haloalquilo, heterociclico y/o heteroarilo), se puede funcionalizar adicionalmente donde al menos un átomo de hidrógeno se reemplaza por un enlace a un sustituyente que no es un átomo de hidrógeno. A menos que se indique específicamente en la especificación, un grupo sustituido puede incluir uno o más sustituyentes seleccionados de: oxo, -CO₂H, nitrilo, nitro, hidroxilo, tiooxi, alquilo, alquieno, alcoxi, alcoxialquilo, alquilcarbonilo, alquiloxicarbonilo, arilo, aralquilo, arilcarbonilo, ariloxicarbonilo, aralquilcarbonilo, aralquiloxicarbonilo, ariloxi, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, cicloalquilcarbonilo, cicloalquilalquilcarbonilo, cicloalquiloxicarbonilo, heterociclico, heteroarilo, dialquiláminas, ariláminas, alquilariláminas, diariláminas, N-óxidos, imidas y enaminas; un átomo de silicio en grupos tales como grupos trialquilsililo, grupos dialquilarilsililo, grupos alquildiarsilsililo, grupos triarilsililo, perfluoroalquilo o perfluoroalcoxi, por ejemplo, trifluorometilo o trifluorometoxi. "Sustituido" también significa cualquiera de los grupos anteriores donde uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan por un enlace de orden superior (*por ejemplo*, un enlace doble o triple) a un heteroátomo tal como oxígeno en grupos oxo, carbonilo, carboxilo y éster; y nitrógeno en grupos tales como iminas, oximas, hidrazonas y nitrilos. Por ejemplo, "sustituido" incluye cualquiera de los grupos anteriores donde uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan con -NR_gC(=O)NR_gR_h, -NR_gC(=O)OR_h, -NR_gSO₂R_h, -OC(=O)NR_gR_h, -OR_g, -SR_g, -SOR_g, -SO₂R_g, -OSO₂R_g, -SO₂OR_g, =NSO₂R_g y -SO₂NR_gR_h. "Sustituido" también significa cualquiera de los grupos anteriores donde uno o más átomos de hidrógeno se reemplazan con -C(=O)R_g, -C(=O)OR_g, -CH₂SO₂R_g, -CH₂SO₂NR_gR_h, -SH, -SR_g o -SSR_g. En lo anterior, R_g y R_h son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo, alcoxi, alquilamino, tioalquilo, arilo, aralquilo, cicloalquilo, cicloalquilalquilo, haloalquilo, heterociclico, n-heterociclico, heterocicliclalquilo, heteroarilo, n-heteroarilo y/o heteroarilalquilo. Además, cada uno de los sustituyentes anteriores también puede estar opcionalmente sustituido con uno o más de los sustituyentes anteriores. Además, cualquiera de los grupos anteriores puede sustituirse para incluir uno o más átomos internos de oxígeno o azufre. Por ejemplo, un grupo alquilo puede estar sustituido con uno o más átomos de oxígeno internos para formar un grupo éter o poliéter. De manera similar, un grupo alquilo puede sustituirse con uno o más átomos de azufre internos para formar un tioéter, disulfuro, etc. Los restos amidilo pueden sustituirse con hasta 2 átomos de halo, mientras que otros grupos anteriores pueden sustituirse con uno o más átomos de halo. Con la excepción de los grupos alquilo, todos los demás grupos también pueden estar sustituidos con amino o monoalquilamino. Con la excepción de los grupos alquilo y alquilcarbonilo, todos los demás grupos también pueden estar sustituidos con guanidinilo o amidinilo. Los sustituyentes opcionales para cualquiera de los grupos anteriores también incluyen arilfosforilo, por ejemplo, -R_aP(Ar)₃, donde R_a es un alquieno y Ar es un resto arilo, por ejemplo, fenilo.

"Alquilo inferior" se refiere a un radical alquilo de uno a seis átomos de carbono, como por ejemplo metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, t-butilo, isoamilo, n-pentilo e isopentilo. En ciertas realizaciones, un grupo "alquilo inferior" tiene de uno a cuatro átomos de carbono. En otras realizaciones, un grupo "alquilo inferior" tiene de uno a dos átomos de carbono; es decir, metilo o etilo. Análogamente, "alquenilo inferior" se refiere a un radical alquenilo de dos a seis, preferiblemente tres o cuatro, átomos de carbono, como por ejemplo alilo y butenilo.

50 55 60

Un sustituyente "que no interfiere" es uno que no afecta negativamente a la capacidad de un oligómero antisentido como se describe en el presente documento para unirse a su objetivo previsto. Dichos sustituyentes incluyen grupos pequeños y/o relativamente no polares como metilo, etilo, metoxi, etoxi o flúor.

Direccionamiento de LMNA

55

Los ejemplos incluyen oligonucleótidos antisentido que se dirigen a SEQ ID NO: 1 y/o 2, discutidos a continuación.

60

Ciertos oligonucleótidos antisentido pueden comprender una secuencia de direccionamiento que es complementaria a una o más bases del exón 11 en el gen LMNA humano, incluida la secuencia de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) y/o la secuencia encontrada en pacientes con HGPS, como se muestra en SEQ ID NO: 2. Estas secuencias objetivo se muestran en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Secuencias objetivo ejemplares de LMNA

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
--------	-----------	------------

LMNA exón 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTGGGGACCCGCTGA GTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGA CCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCAGGTGGG <u>C</u> GGACCCATCTCCTC TGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACGGTCACTCGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCGGGGACAATCTGGTCACCCGCTCCTACCTCCT GGGCAACTCCAGCCCCGAACCCAG	1
HGPS exón 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTGGGGACCCGCTGA GTACAACCTGCGCTCGCGCACCGTGCTGTGCGGGA CCTGCGGGCAGCCTGCCGACAAGGCATCTGCCAGC GGCTCAGGAGCCAGGTGGG <u>T</u> GGACCCATCTCCTC TGGCTCTTCTGCCTCCAGTGTACGGTCACTCGCA GCTACCGCAGTGTGGGGGCAGTGGGGGTGGCAGC TTCGGGGACAATCTGGTCACCCGCTCCTACCTCCT GGGCAACTCCAGCCCCGAACCCAG	2

Los ejemplos incluyen oligonucleótidos antisentido que son completamente complementarios al exón 11 de LMNA (SEQ ID NO: 1 o 2), incluidos aquellos que también son complementarios al sitio de empalme críptico del exón 11 de LMNA subrayado en SEQ ID NO: 1 y 2 en la Tabla 1 (por ejemplo, CAGGTGGG/CT). Ciertos oligonucleótidos antisentido pueden 5 comprender una secuencia de direccionamiento donde la base más 3' es complementaria a una base en el exón 11 de LMNA que es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases corriente abajo del sitio de empalme críptico subrayado en SEQ ID NO:1 o 2 (ver Tabla 1), o que es complementario a una base en LMNA exón 11 que es 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 10 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 corriente arriba del sitio de empalme críptico. Los oligonucleótidos de este tipo se encuentran entre los enumerados a continuación como SEQ ID NO: 4 y 11.

Las secuencias de direccionamiento antisentido seleccionadas se pueden acortar, *por ejemplo*, alrededor de 12 bases, o más, *por ejemplo*, alrededor de 40 bases, e incluyen una pequeña cantidad de desajustes, siempre que la secuencia sea lo suficientemente complementaria para efectuar el empalme y/u otra forma de inhibición tras la hibridación con el objetivo, 15 y forma con el ARN objetivo, un heterodúplex que tiene una Tm de 45 °C o mayor.

En ciertas realizaciones, el grado de complementariedad entre el objetivo y la secuencia de direccionamiento antisentido es suficiente para formar un dúplex estable. La región de complementariedad de los oligómeros antisentido con la secuencia de ARN objetivo puede ser tan corta como de 8 a 11 bases, pero preferiblemente es de 12 a 15 bases o más, 20 *por ejemplo*, 12-20 bases, 12-25 o 15-25 bases, incluidos todos los números enteros y rangos entre estos rangos. Un oligómero antisentido de aproximadamente 14-15 bases es generalmente lo suficientemente largo para tener una secuencia complementaria única en el ARNm objetivo. En ciertas realizaciones, se puede requerir una longitud mínima de bases complementarias para lograr la Tm de unión requerida, como se analiza a continuación.

25 Se incluyen oligómeros antisentido (PMO) que constan de 25 bases, donde al menos aproximadamente 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 bases contiguas y/o no contiguas son complementarias a una secuencia objetivo descrita en el presente documento, incluidas las secuencias objetivo de SEQ ID NO: 1 y/o 2, o variantes de los mismos.

30 En ciertas realizaciones, los oligómeros antisentido pueden ser 100 % complementarios a la secuencia objetivo de ácido nucleico pre-ARNm de LMNA, o pueden incluir desajustes, por ejemplo, para acomodar variantes, siempre que un heterodúplex formado entre el oligómero y la secuencia objetivo sea suficientemente estable, resistir la acción de las nucleasas celulares y otros modos de degradación o desplazamiento que puedan ocurrir *in vivo*. Los esqueletos de oligómeros que son menos susceptibles a la escisión por nucleasas se analizan a continuación. Los desajustes, si están 35 presentes, son menos desestabilizadores hacia las regiones finales del dúplex híbrido que hacia el medio. El número de desajustes permitidos dependerá de la longitud del oligómero, el porcentaje de pares de bases G:C en el dúplex y la posición de los desajustes en el dúplex, de acuerdo con principios bien conocidos de estabilidad de dúplex. Aunque dicho oligómero antisentido no es necesariamente 100 % complementario a la secuencia objetivo, es eficaz para unirse de manera estable y específica a la secuencia objetivo, de modo que una actividad biológica del ácido nucleico objetivo, *por ejemplo*, se modula la expresión de la(s) proteína(s) de progerina.

40 La estabilidad del dúplex formado entre un oligómero y una secuencia objetivo es función de la Tm de unión y de la susceptibilidad del dúplex a la escisión enzimática celular. La Tm de un compuesto antisentido con respecto al ARN de secuencia complementaria puede medirse por métodos convencionales, como los descritos por Hames et al., Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, 1985, pp. 107-108 o como se describe en Miyada C.G. y Wallace R.B., 1987, Técnicas de hibridación de oligonucleótidos, Methods Enzy mol. Vol. 154 pp. 94-107. En determinadas realizaciones, el oligómero

antisentido puede tener una Tm de unión, con respecto a un ARN de secuencia complementaria, superior a la temperatura corporal y preferiblemente superior a 50 °C. Se prefieren Tm en el rango de 60-80°C o mayores. De acuerdo con principios bien conocidos, la Tm de un compuesto oligómero, con respecto a un híbrido de ARN de base complementaria, se puede aumentar aumentando la proporción de bases apareadas C:G en el dúplex y/o aumentando la longitud (en base pares) 5 del heterodúplex. Al mismo tiempo, con el fin de optimizar la captación celular, puede ser ventajoso limitar el tamaño del oligómero. Por esta razón, los compuestos que muestran una Tm alta (50 °C o más) en una longitud de 25 bases o menos generalmente se prefieren a los que requieren más de 25 bases para valores de Tm altos.

En ciertas realizaciones, como los oligómeros de PMO, la actividad antisentido de un oligómero se puede mejorar 10 mediante el uso de una mezcla de enlaces fosforodiamidato catiónicos y sin carga, como se exemplifica en la Figura 1C. El número total de enlaces catiónicos en el oligómero puede variar de 1 a 10 (incluidos todos los números enteros intermedios) y estar esparcidos por todo el oligómero. Preferiblemente, el número de enlaces cargados es de al menos 2 y no más de la mitad del total de enlaces troncales, *por ejemplo*, entre 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 enlaces cargados positivamente, 15 y preferiblemente cada enlace cargado está separado a lo largo del esqueleto por al menos 1, 2, 3, 4 o 5 enlaces no cargados. Un enlace catiónico preferido de la invención incluye el enlace apn B10 como se muestra en la Tabla 3.

En la Tabla 1 a continuación se muestran ejemplos de secuencias antisentido para dirigirse al pre-ARNm de LMNA humano. Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender la totalidad o una parte de estas secuencias de direcciónamiento.

20 Tabla 2. Secuencias ejemplares de focalización de HGPS*

Nombre de PMO	Secuencia de direccionamiento 5' - 3'	SEQ ID NO:
Exo11.25.138	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCTTGTC	4
Exo11.25.166	GAGGAGATGGTCCACCCACCTGGG	11

* AcR₆G indica un transportador peptídico de penetración celular preferido (R₆ acilado; SEQ ID NO 45) conjugado con un enlazador de glicina en el extremo 3' de una secuencia de direccionamiento ejemplar. El ^{apn}T en SEQ ID NO 19 y 20 se refiere a un enlace entre subunidades apn como se describe más adelante en la Tabla 3, enlace B10.

Compuestos de oligonucleótidos antisentido

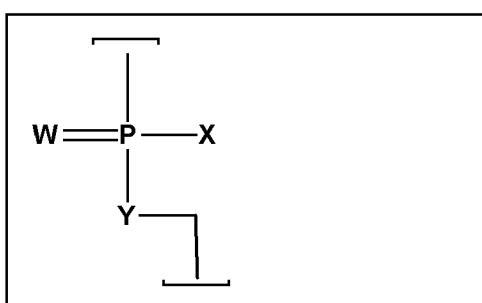
30 Los oligonucleótidos antisentido para uso en la presente invención normalmente (a) tienen la capacidad de ser captados activamente por células de mamífero y (b) una vez captados, forman un dúplex con el ARN objetivo con una Tm superior a aproximadamente 45 °C. En ciertas realizaciones, el esqueleto del oligómero puede estar sustancialmente descargado y, preferiblemente, puede reconocerse como un sustrato para el transporte activo o facilitado a través de la membrana 35 celular. La capacidad del oligómero para formar un dúplex estable con el ARN objetivo también puede relacionarse con otras características de la estructura del oligómero, incluida la longitud y el grado de complementariedad del oligómero antisentido con respecto al objetivo, la proporción de G:C a A:T coincidencias de bases y las posiciones de las bases no coincidentes. La capacidad del oligómero antisentido para resistir las nucleasas celulares puede promover la supervivencia y el suministro final del agente al citoplasma celular. Se incluyen oligómeros antisentido compuestos de PMO, PMO (PMOplus), PMO-X, químicas, descritas en este documento.

40 La estructura del oligómero emplea subunidades basadas en morfolino que llevan restos de apareamiento de bases, unidos por enlaces sin carga, como se describe anteriormente. Se prefiere especialmente un oligómero de morfolino unido a fosforodiamidato (PMO) sustancialmente sin carga. Los oligonucleótidos de morfolino, incluidos los oligómeros antisentido, se detallan, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. Núms. 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.185, 444, 5.521.063 y 5.506.337, y en la solicitud PCT No. US08/088339.

50 Ciertas propiedades de las subunidades basadas en morfolino incluyen: la capacidad de unirse en una forma oligomérica mediante enlaces de columna vertebral estables y sin carga; la capacidad de soportar una base de nucleótidos (*por ejemplo*, adenina, citosina, guanina o uracilo) de modo que el polímero formado pueda hibridar con un ácido nucleico objetivo de base complementaria, incluido el ARN objetivo, con Tm alta, incluso con oligómeros tan cortos como 10-14 bases; la capacidad del oligómero para ser transportado activamente a células de mamíferos; y la capacidad del heterodúplex oligómero:ARN para resistir la degradación de la ARNasa.

55 Las propiedades de las subunidades basadas en morfolino incluyen: 1) la capacidad de unirse en forma oligomérica mediante enlaces de cadena principal estables, sin carga o con carga positiva; 2) la capacidad de soportar una base de nucleótidos (*por ejemplo*, adenina, citosina, guanina, timidina, uracilo e hipoxantina) de modo que el polímero formado pueda hibridarse con un ácido nucleico objetivo de base complementaria, incluido el ARN objetivo, valores de Tm superiores a unos 45 °C en oligonucleótidos relativamente cortos (*por ejemplo*, 10-15 bases); 3) la capacidad del oligonucleótido para ser transportado activa o pasivamente al interior de células de mamífero; y 4) la capacidad del oligonucleótido antisentido:heterodúplex de ARN para resistir la degradación de ARNasa y ARNasaH, respectivamente.

- En las Figuras 1A-1C se ilustran oligonucleótidos de morfolino que tienen enlace de columna vertebral que contienen fosforo. Un oligonucleótido de morfolino enlazado con fósforodiamidato preferido se muestra en la Figura 1C, que se modifica, de acuerdo con un aspecto de la presente invención, para contener grupos cargados positivamente en preferiblemente el 10%-50% de sus enlaces principales. Las estructuras ejemplares de la columna vertebral para los oligonucleótidos antisentido del tema reivindicado incluyen los tipos de subunidades de morfolino que se muestran en las Figuras 1A-1C, cada uno unido por un enlace de subunidad que contiene fósforo, sin carga o con carga positiva. La Figura 1D muestra un enlace que contiene fósforo que forma el esqueleto de unidad repetitiva de cinco átomos, donde los anillos de morfolino están unidos por un enlace de fosfoamida de 1 átomo. La figura 1E muestra un enlace que produce un esqueleto de unidades repetitivas de 6 átomos. En esta estructura, el átomo Y que une el carbono 5' morfolino al grupo fósforo puede ser azufre, nitrógeno, carbono o, preferentemente, oxígeno. El resto X pendiente del fósforo puede ser flúor, un alquilo o alquilo sustituido, un alcoxi o alcoxi sustituido, un tioalcoxi o tioalcoxi sustituido, o nitrógeno no sustituido, monosustituido o disustituido, incluidas estructuras cíclicas, tales como morfolinas o piperidinas. Alquilo, alcoxi y tioalcoxi incluyen preferentemente de 1 a 6 átomos de carbono. Los restos Z son azufre u oxígeno y son preferiblemente oxígeno.
- 5 Los enlaces mostrados en las Figuras 1F y 1G están diseñados para redes troncales de 7 átomos de longitud unitaria. En la Figura 1F, el resto X es como en la Figura 1E, y el resto Y puede ser metileno, azufre o, preferiblemente, oxígeno. En la Figura 1G, los restos X e Y son como en la Figura 1E. Los oligonucleótidos de morfolino particularmente preferidos incluyen aquellos compuestos por estructuras de subunidades de morfolino de la forma que se muestra en la Figura 1E, donde X=NH₂, N(CH₃)₂ o 1-piperazina u otro grupo cargado, Y=O y Z=O.
- 10 20 Como se señaló anteriormente, el oligonucleótido sustancialmente sin carga puede modificarse, de acuerdo con un aspecto de la invención, para incluir enlaces cargados, *por ejemplo*, hasta alrededor de 1 por cada 2 a 5 enlaces sin carga, como alrededor de 4 a 5 por cada 10 enlaces sin carga. En determinadas realizaciones, se puede observar una mejora óptima en la actividad antisentido cuando aproximadamente el 25 % de los enlaces de la columna vertebral son catiónicos.
- 25 30 35 40 En ciertas realizaciones, la mejora se puede ver con un pequeño número, *por ejemplo*, 10-20% de enlaces catiónicos, o donde el número de enlaces catiónicos está en el rango de 50-80%, tal como alrededor de 60%. La mejora observada con las cargas catiónicas agregadas del esqueleto puede, en algunos casos, mejorarse aún más distribuyendo la mayor parte de las cargas cerca de los enlaces del esqueleto de la "región central" del oligonucleótido antisentido, *por ejemplo*, en un oligonucleótido de 20 unidades con 8 enlaces catiónicos en el esqueleto, que tiene al menos el 70% de estos enlaces cargados localizados en los 10 enlaces más centrales.
- 45 En ciertas realizaciones, los compuestos antisentido se pueden preparar mediante síntesis en fase sólida por etapas, empleando métodos detallados en las referencias citadas anteriormente y más adelante con respecto a la síntesis de oligonucleótidos que tienen una mezcla de enlaces catiónicos y sin carga. En algunos casos, puede ser deseable agregar restos químicos adicionales al compuesto antisentido, *por ejemplo*, para mejorar la farmacocinética o para facilitar la captura o detección del compuesto. Dicho resto se puede unir covalentemente, típicamente a un extremo del oligómero, de acuerdo con métodos sintéticos estándar. Por ejemplo, la adición de un resto de polietilenglicol u otro polímero hidrofílico, *por ejemplo*, uno que tiene de 10 a 100 subunidades monoméricas, puede ser útil para mejorar la solubilidad. Uno o más grupos cargados, *por ejemplo*, los grupos aniónicos cargados, como un ácido orgánico, pueden mejorar la absorción celular.
- 50 Se puede unir un resto reportero, como fluoresceína o un grupo radiomarcado, con fines de detección. Alternativamente, la etiqueta indicadora unida al oligómero puede ser un ligando, como un antígeno o biotina, capaz de unirse a un anticuerpo marcado o estreptavidina. Al seleccionar un resto para unir o modificar un compuesto antisentido, por supuesto, generalmente es deseable seleccionar compuestos químicos de grupos que sean biocompatibles y que probablemente sean tolerados por un sujeto sin efectos secundarios indeseables.
- Como se indicó anteriormente, algunos de los compuestos antisentido se pueden construir para que contengan un número seleccionado de enlaces catiónicos intercalados con enlaces sin carga del tipo descrito anteriormente. Los enlaces entre subunidades, tanto sin carga como catiónicos, son preferiblemente enlaces que contienen fósforo, que tienen la estructura:



dónde

55

W es S u O, y es preferiblemente O,

X = NR¹R² o OR⁶,

Y = O o NR⁷,

y cada dicho enlace en el oligómero se selecciona de:

- 5 (a) enlace sin carga (a), donde cada uno de R¹, R², R⁶ y R⁷ se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior;
 (b1) enlace catiónico (b1), donde X = NR¹R² e Y = O, y NR¹R² representa un grupo piperazino opcionalmente sustituido, tal que R¹R² = -CHRCHRN(R³)(R⁴)CHRCHR-, donde cada R es independientemente H o CH₃,
- 10 R⁴ es H, CH₃ o un par de electrones, y R³ se selecciona de H, alquilo inferior, *por ejemplo*, CH₃, C(=NH)NH₂, ZL-NHC(=NH)NH₂ y [C(O)CHR'NH]_mH, donde: Z es C(O) o un enlace directo, L es un enlazador opcional de hasta 18 átomos de longitud, preferentemente de hasta 12 átomos, y más preferentemente de hasta 8 átomos de longitud, con enlaces seleccionados entre alquilo, alcoxi y alquilamino, R' es una cadena lateral de un aminoácido natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6, preferiblemente de 1 a 4;
- 15 (b2) enlace catiónico (b2), donde X = NR¹R² y Y = O, R¹ = H o CH₃, y R² = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³ y R⁴ son como se definen anteriormente, y R⁵ es H, alquilo inferior o alquilo(alcoxi) inferior; y
 (b3) enlace catiónico (b3), donde Y = NR⁷ y X = OR⁶, y R⁷ = LNR³R⁴R⁵, donde L, R³, R⁴ y R⁵ son como se definen anteriormente, y R⁶ es H o alquilo inferior;
- 20 y al menos uno de dichos enlaces se selecciona de los enlaces catiónicos (b1), (b2) y (b3).

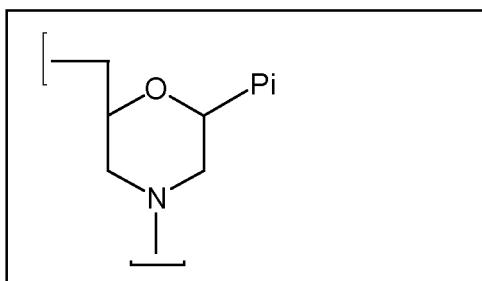
En ciertas realizaciones, un oligómero puede incluir al menos dos enlaces consecutivos de tipo (a) (*es decir* enlaces sin carga). En realizaciones adicionales, al menos el 5% de los enlaces en el oligómero son enlaces catiónicos (*es decir* tipo (b1), (b2) o (b3)); *por ejemplo*, del 10% al 60%, y preferiblemente del 20 al 50%, los enlaces pueden ser enlaces catiónicos.

- 25 En una realización, al menos un enlace es de tipo (b1), donde, preferiblemente, cada R es H, R⁴ es H, CH₃ o un par de electrones, y R³ se selecciona de H, alquilo inferior, *por ejemplo*, CH₃, C(=NH)NH₂ y C(O)-L-NHC(=NH)NH₂. Las dos últimas realizaciones de R³ proporcionan un resto guanidino, ya sea unido directamente al anillo de piperazina o pendiente de un enlazador grupo L, respectivamente. Para facilitar la síntesis, la variable Z en R³ es preferiblemente C(O) (carbonilo), como se muestra.

- 30 El grupo enlazador L, como se señaló anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados de alquilo (*por ejemplo*, -CH₂-CH₂-), alcoxi (-CO-) y alquilamino (*por ejemplo*, -CH₂-NH-), con la condición de que los átomos terminales en L (*por ejemplo*, los adyacentes al carbonilo o al nitrógeno) son átomos de carbono. Aunque los enlaces ramificados (*por ejemplo*, -CH₂-CH(CH₃)-), el enlazador preferiblemente no está ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburo. Dicho enlazador puede tener la estructura -(CH₂)_n-, donde n es 1-12, preferiblemente 2-8 y más preferiblemente 2-6.

35 Las subunidades de morfolino pueden tener la estructura:

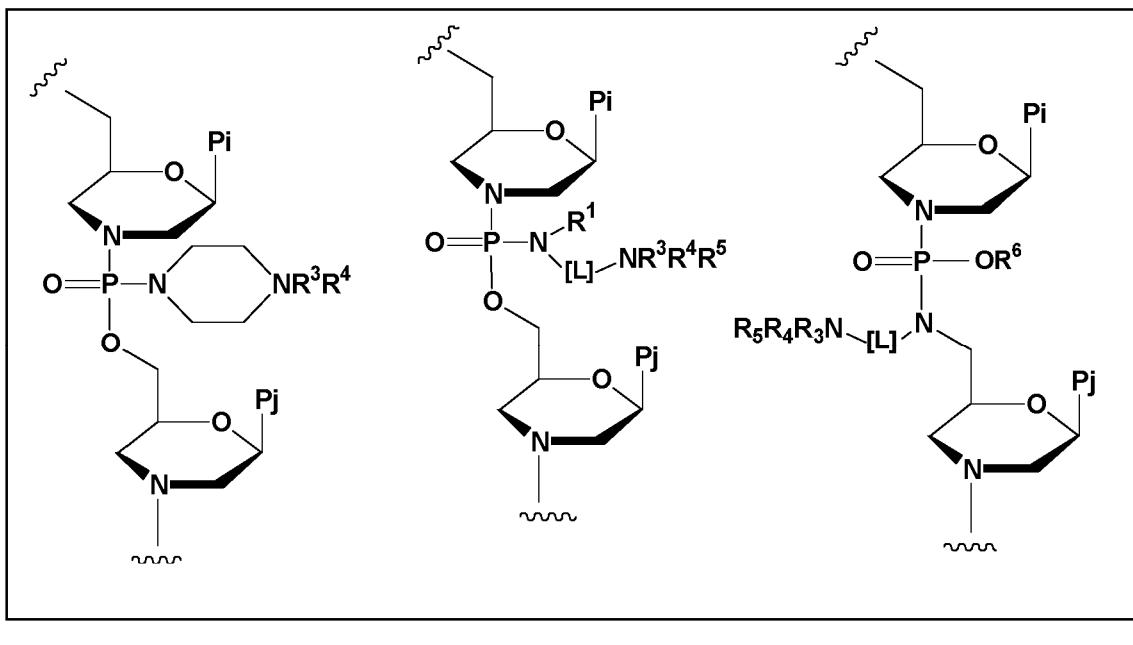
40



(i)

- 45 donde Pi es un resto de apareamiento de bases, y los enlaces descritos arriba conectan el átomo de nitrógeno de (i) con el carbono 5' de una subunidad adyacente. Los restos de apareamiento de bases Pi pueden ser iguales o diferentes, y generalmente están diseñados para proporcionar una secuencia que se une a un ácido nucleico objetivo. El uso de realizaciones de los tipos de enlace (b1), (b2) y (b3) anteriores para unir subunidades de morfolino puede ilustrarse gráficamente como sigue:

50



(b1)

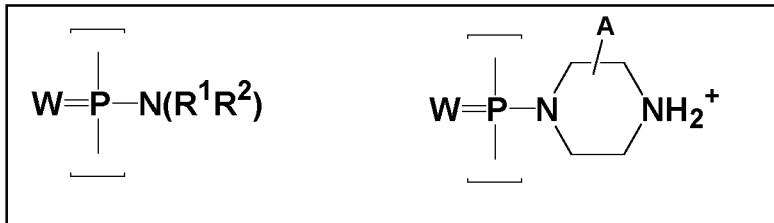
(b2)

(b3)

Preferiblemente, todos los enlaces catiónicos en el oligómero son del mismo tipo; *es decir* todo tipo (b1), todo tipo (b2) o todo tipo (b3).

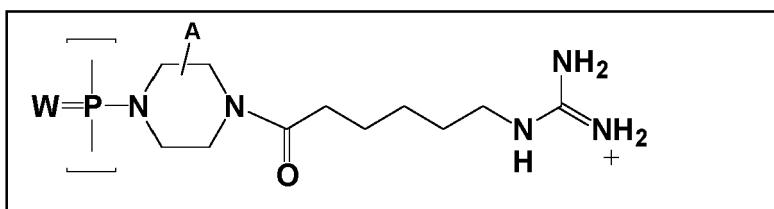
5

En realizaciones adicionales, los enlaces catiónicos se seleccionan de enlaces (b1') y (b1'') como se muestra a continuación, donde (b1') se denomina aquí enlace "Pip" y (b1'') se denomina aquí enlace "GuX":



10

(a) (b1')



(b1'')

15

En las estructuras anteriores, W es S u O, y es preferiblemente O; cada uno de R¹ y R² se selecciona independientemente de hidrógeno y alquilo inferior, y es preferiblemente metilo; y A representa hidrógeno o un sustituyente que no interfiere en uno o más átomos de carbono en (b1') y (b1''). Preferiblemente, los carbonos del anillo en el anillo de piperazina no están sustituidos; sin embargo, pueden incluir sustituyentes que no interfieran, como metilo o flúor. Preferiblemente, como máximo uno o dos átomos de carbono están así sustituidos. En realizaciones adicionales, al menos el 10 % de los enlaces son del tipo (b1') o (b1''); por ejemplo, del 10 % al 60 % y preferiblemente del 20 % al 50 % de los enlaces pueden ser del tipo (b1') o (b1'').

20

En ciertas realizaciones, el oligómero no contiene enlaces del tipo (b1') anterior. Alternativamente, el oligómero no contiene enlaces de tipo (b1) donde cada R es H, R³ es H o CH₃ y R⁴ es H, CH₃ o un par de electrones.

Las subunidades de morfolino también pueden estar unidas por enlaces entre subunidades no basados en fósforo, como se describe más adelante, donde al menos un enlace se modifica con un grupo catiónico pendiente como se describe anteriormente.

5 Se podrían usar otros enlaces de análogos de oligonucleótidos que no estén cargados en su estado no modificado pero que también podrían llevar un sustituyente de amina colgante. Por ejemplo, un átomo de nitrógeno 5' en un anillo de morfolino podría emplearse en un enlace sulfamida o un enlace urea (donde el fósforo se reemplaza con carbono o azufre, respectivamente) y modificarse de una manera análoga al átomo de nitrógeno 5' en estructura (b3) anterior.

10 Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier número de enlaces catiónicos, incluidos los oligómeros con enlaces catiónicos completos. Preferiblemente, sin embargo, los oligómeros están parcialmente cargados, teniendo, por ejemplo, 10%-80%. En realizaciones preferidas, alrededor del 10 % al 60 % y preferiblemente del 20 % al 50 % de los enlaces son catiónicos.

15 En una realización, los enlaces catiónicos se intercalan a lo largo del esqueleto. Los oligómeros parcialmente cargados contienen preferiblemente al menos dos enlaces no cargados consecutivos; es decir, el oligómero preferiblemente no tiene un patrón estrictamente alterno a lo largo de toda su longitud.

20 También se consideran oligómeros que tienen bloques de enlaces catiónicos y bloques de enlaces sin carga; por ejemplo, un bloque central de enlaces sin carga puede estar flanqueado por bloques de enlaces catiónicos, o viceversa. En una realización, el oligómero tiene regiones 5', 3' y centrales de aproximadamente la misma longitud, y el porcentaje de enlaces catiónicos en la región central es mayor que aproximadamente el 50%, preferiblemente mayor que aproximadamente el 70%.

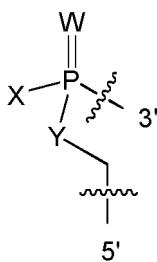
25 Los oligómeros para uso en aplicaciones antisentido generalmente varían en longitud desde alrededor de 10 a alrededor de 40 subunidades, más preferiblemente alrededor de 10 a 30 subunidades, y típicamente 15-25 bases. Por ejemplo, un oligómero para usar en la invención que tiene 25 subunidades, una longitud útil para un compuesto antisentido, idealmente puede tener de dos a diez, *por ejemplo*, cuatro a ocho, enlaces catiónicos, y el resto enlaces sin carga. Un oligómero que tiene 14-15 subunidades idealmente puede tener de dos a siete, *por ejemplo*, 3, 4 ó 5, enlaces catiónicos y el resto enlaces sin carga.

30 35 Cada estructura de anillo de morfolino soporta un resto de apareamiento de bases, para formar una secuencia de restos de apareamiento de bases que normalmente se diseña para hibridarse con un objetivo antisentido seleccionado en una célula o en un sujeto que se está tratando. El resto de emparejamiento de bases puede ser una purina o pirimidina que se encuentra en el ADN o ARN nativo (*por ejemplo*, A, G, C, T o U) o un análogo, como hipoxantina (el componente base del nucleósido inosina) o 5-metil citosina.

40 45 Como se indicó anteriormente, ciertas realizaciones están dirigidas a oligómeros que comprenden nuevos enlaces entre subunidades, incluidos los oligómeros PMO-X y aquellos que tienen grupos terminales modificados. En algunas realizaciones, estos oligómeros tienen una mayor afinidad por el ADN y el ARN que los oligómeros no modificados correspondientes y demuestran propiedades mejoradas de suministro celular, potencia y/o distribución tisular en comparación con los oligómeros que tienen otros enlaces entre subunidades. En una realización, los oligómeros comprenden al menos un enlace entre subunidades de tipo (B) como se define aquí. Los oligómeros también pueden comprender uno o más enlaces entre subunidades de tipo (A) como se define en este documento. Las características y propiedades estructurales de los diversos tipos de enlaces y oligómeros se describen con más detalle en la siguiente discusión. La síntesis de estos y oligómeros relacionados se describe en la Solicitud en copropiedad US Núm. 13/118.298.

Enlace (A)

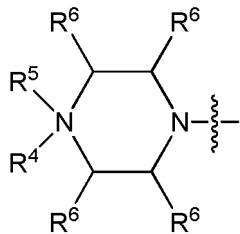
50 Los solicitantes han descubierto que la mejora de la actividad antisentido, la biodistribución y/u otras propiedades deseables pueden optimizarse preparando oligómeros que tengan varios enlaces entre subunidades. Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender opcionalmente uno o más enlaces entre subunidades de tipo (A) y, en ciertas realizaciones, los oligómeros comprenden al menos un enlace de tipo (A). En algunas otras realizaciones cada enlace de tipo (A) tiene la misma estructura. Los enlaces de tipo (A) pueden incluir enlaces descritos en la patente de EE. UU. en copropiedad número 7.943.762. El enlace (A) tiene la siguiente estructura (I), donde 3' y 5' indican el punto de unión a los extremos 3' y 5', respectivamente, del anillo de morfolino (es decir, la estructura (i) discutida a continuación):



I

o una de sus sales o isómeros, en donde:

- 5 W es, cada vez que aparece, independientemente S u O;
 X es, cada vez que aparece, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$ o;



(II)

- 10 Y es, cada vez que aparece, independientemente O o $-NR^2$,
 R^1 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo;
 R^2 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o $-LNR^4R^5R^7$;
 R^3 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆;
 R^4 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆, $-C(=NH)NH_2$, $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$ o $-[C(=O)CHR'NH]_mH$, donde Z es $-C(=O)-$ o un enlace directo, R' es una cadena lateral de un aminoácido natural o un homólogo de uno o dos carbonos del mismo, y m es de 1 a 6;
 R^5 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones;
 R^6 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo;
 R^7 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno alquilo C₁-C₆ o alcoxialquilo C₁-C₆; y
 15 L es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende grupos alquilo, alcoxi o alquilamino, o combinaciones de los mismos.

En algunos ejemplos, el oligómero comprende al menos un enlace de tipo (A). En algunas otras realizaciones, el oligómero incluye al menos dos enlaces consecutivos de tipo (A). En realizaciones adicionales, al menos el 5 % de los enlaces en el oligómero son del tipo (A); por ejemplo, en algunas realizaciones, del 5 % al 95 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 50 % o del 10 % al 35 % de los enlaces pueden ser del tipo de enlace (A). En algunas realizaciones específicas, al menos un enlace de tipo (A) es $-N(CH_3)_2$. En otras realizaciones, cada enlace de tipo (A) es $-N(CH_3)_2$. En otras realizaciones, al menos un enlace de tipo (A) es piperazin-1-ilo, por ejemplo, piperazin-1-ilo no sustituido (por ejemplo, A2 o A3). En otras realizaciones, cada enlace de tipo (A) es piperazin-1-ilo, por ejemplo, piperazin-1-ilo no sustituido.

30 En algunas realizaciones, W es, cada vez que aparece, independientemente S u O, y en ciertas realizaciones W es O.

En algunas realizaciones, X es, cada vez que aparece, independientemente $-N(CH_3)_2$, $-NR^1R^2$, $-OR^3$. En algunas realizaciones X es $-N(CH_3)_2$. En otros aspectos X es $-NR^1R^2$, y en otros ejemplos X es $-OR^3$.

35 En algunas realizaciones, R^1 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, R^1 es hidrógeno. En otras realizaciones, X es metilo.

En algunas realizaciones, R^2 es, cada vez que aparece, hidrógeno. En otras realizaciones, R^2 es, cada vez que aparece, $-LNR^4R^5R^7$. En algunas realizaciones, R^3 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆. En otras realizaciones, R^3 es metilo. En aún otras realizaciones, R^3 es etilo. En algunas otras realizaciones, R^3 es n-propilo o isopropilo. En algunas otras realizaciones, R^3 es alquilo C₄. En otras realizaciones, R^3 es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R^3 es alquilo C₆.

45 En ciertas realizaciones, R^4 es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno. En otras realizaciones, R^4 es metilo o etilo. En aún otras realizaciones, R^4 es $-C(=NH)NH_2$, y en otras realizaciones, R^4 es $-Z-L-NHC(=NH)NH_2$. En aún

otras realizaciones, R⁴ es -[C(=O)CHR'NH]_mH. Z es -C(=O)- en una realización y Z es un enlace directo en otra realización. R' es una cadena lateral de un aminoácido natural. En algunas realizaciones, R' es un homólogo de uno o dos carbonos de una cadena lateral de un aminoácido natural.

5 m es un número entero de 1 a 6. m puede ser 1. m puede ser 2 m puede ser 3 m puede ser 4 m puede ser 5 m puede ser 6

10 En algunas realizaciones, R⁵ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, metilo o un par de electrones. En algunas realizaciones, R⁵ es hidrógeno. En otras realizaciones, R⁵ es metilo. En aún otras realizaciones, R⁵ es un par de electrones.

En algunas realizaciones, R⁶ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o metilo. En algunas realizaciones, R⁶ es hidrógeno. En otras realizaciones, R⁶ es metilo.

15 En otras realizaciones, R⁷ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno alquilo C₁-C₆ o alcoxialquilo C₂-C₆. En algunas realizaciones, R⁷ es hidrógeno. En otras realizaciones, R⁷ es alquilo C₁-C₆. En aún otras realizaciones, R⁷ es alcoxialquilo C₂-C₆. En algunas realizaciones, R⁷ es metilo. En otras realizaciones, R⁷ es etilo. En aún otras realizaciones, R⁷ es n-propilo o isopropilo. En algunas otras realizaciones, R⁷ es alquilo C₄. En algunas realizaciones, R⁷ es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R⁷ es alquilo C₆. En aún otras realizaciones, R⁷ es alcoxialquilo C₂. En algunas otras realizaciones, R⁷ es alcoxialquilo C₃. En aún otras realizaciones, R⁷ es alcoxialquilo C₄. En algunas realizaciones, R⁷ es alcoxialquilo C₅. En otras realizaciones, R⁷ es alcoxialquilo C₆.

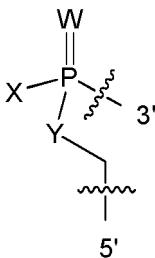
25 El grupo conector L, como se indicó anteriormente, contiene enlaces en su cadena principal seleccionados de alquilo (por ejemplo, -CH₂-CH₂-), alcoxi (por ejemplo, -C-O-C-) y alquilamino (por ejemplo, -CH₂-NH-), con la condición de que los átomos terminales en L (por ejemplo, los adyacentes al carbonilo o al nitrógeno) son átomos de carbono. Aunque los enlaces ramificados (por ejemplo, -CH₂-CHCH₃-) son posibles, el enlazador generalmente no está ramificado. En una realización, el enlazador es un enlazador de hidrocarburo. Dicho enlazador puede tener la estructura (CH₂)_n, donde n es 1-12, preferiblemente 2-8 y más preferiblemente 2-6.

30 35 Se proporcionan oligómeros que tienen cualquier tipo de enlace (A). En algunas realizaciones, el oligómero no contiene enlaces de tipo (A). En ciertas realizaciones, el 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 por ciento de los enlaces son enlaces (A). En realizaciones seleccionadas, del 10 al 80, del 20 al 80, del 20 al 60, del 20 al 50, del 20 al 40 o del 20 al 35 por ciento de los enlaces son enlaces (A).

35 Enlace (B)

En algunas realizaciones, los oligómeros comprenden al menos un enlace de tipo (B). Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más enlaces de tipo (B). Los enlaces de tipo (B) pueden ser adyacentes o pueden estar espaciados por todo el oligómero. El tipo de enlace (B) tiene la siguiente estructura (I):

40

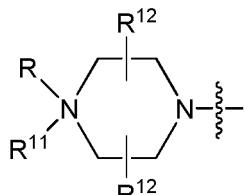


(I)

o una de sus sales o isómeros, en donde:

45 W es, cada vez que aparece, independientemente S u O; X es, cada vez que aparece, independientemente -NR⁸R⁹ o -OR³; y Y es, cada vez que aparece, independientemente O o -NR¹⁰, R³ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆; R⁸ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂; 50 R⁹ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo; R¹⁰ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o -LNR⁴R⁵R⁷; donde R⁸ y R⁹ pueden unirse para formar un heterociclo mono o bicíclico de 5-18 miembros o R⁸, R⁹ o R³ pueden unirse con R¹⁰ para formar un heterociclo de 5-7 miembros, y donde cuando X es 4-piparazino, X tiene la siguiente estructura (III):

55



(III)

donde:

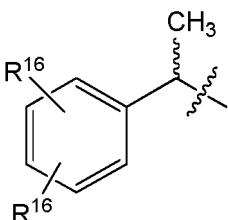
- 5 R¹¹ es, cada vez que aparece, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, alquilcarbonilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclo;
 R es, cada vez que aparece, independientemente un par de electrones, hidrógeno o alquilo C₁-C₁₂; y
 R¹² es, cada vez que aparece, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴,
 10 -NR¹³R¹⁴R¹⁵, C₁-C₁₂ alquilcarbonilo, oxo, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonilo
 guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi
 C₁-C₁₂, donde R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, cada vez que aparecen, independientemente alquilo C₁-C₁₂.

En algunos ejemplos, el oligómero comprende un enlace de tipo (B). En algunas otras realizaciones, el oligómero comprende dos enlaces de tipo (B). En algunas otras realizaciones, el oligómero comprende tres enlaces de tipo (B). En 15 algunas otras realizaciones, el oligómero comprende cuatro enlaces de tipo (B). En aún otras realizaciones, los enlaces de tipo (B) son consecutivos (*es decir*, los enlaces de tipo (B) son adyacentes entre sí). En realizaciones adicionales, al menos el 5 % de los enlaces en el oligómero son de tipo (B); por ejemplo, en algunas realizaciones, del 5 % al 95 %, del 10 % al 90 %, del 10 % al 50 % o del 10 % al 35 % de los enlaces pueden ser del tipo de enlace (B).

- 20 En otras realizaciones, R³ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₁-C₆. En aún otras realizaciones, R³ puede ser metilo. En algunas realizaciones, R³ puede ser etilo. En algunas otras realizaciones, R³ puede ser n-propilo o isopropilo. En aún otras realizaciones, R³ puede ser alquilo C₄. En algunas realizaciones, R³ puede ser alquilo C₅. En algunas realizaciones, R³ puede ser alquilo C₆.
- 25 En algunas realizaciones, R⁸ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno o alquilo C₂-C₁₂. En algunas realizaciones, R⁸ es hidrógeno. En aún otras realizaciones, R⁸ es etilo. En algunas otras realizaciones, R⁸ es n-propilo o isopropilo. En algunas realizaciones, R⁸ es alquilo C₄. En aún otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₅. En otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₆. En algunas realizaciones, R⁸ es alquilo C₇. En aún otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₈. En otras 30 realizaciones, R⁸ es alquilo C₉. En aún otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₁₀. En algunas otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₁₁. En aún otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₁₂. En algunas otras realizaciones, R⁸ es alquilo C₂-C₁₂ y el alquilo C₂-C₁₂ incluye uno o más enlaces dobles (por ejemplo, alqueno), enlaces triples (por ejemplo, alquino) o ambos. En algunas realizaciones, R⁸ es alquilo C₂-C₁₂ no sustituido.

35 En algunas realizaciones, R⁹ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aralquilo C₁-C₁₂ o arilo. En algunas realizaciones, R⁹ es hidrógeno. En aún otras realizaciones, R⁹ es alquilo C₁-C₁₂. En otras realizaciones, R⁹ es metilo. En aún otras realizaciones, R⁹ es etilo. En algunas otras realizaciones, R⁹ es n-propilo o isopropilo. En 40 algunas realizaciones, R⁹ es alquilo C₄. En algunas realizaciones, R⁹ es alquilo C₅. En aún otras realizaciones, R⁹ es alquilo C₆. En algunas otras realizaciones, R⁹ es alquilo C₇. En algunas realizaciones, R⁹ es alquilo C₈. En algunas realizaciones, R⁹ es alquilo C₉. En algunas otras realizaciones, R⁹ es alquilo C₁₀. En algunas otras realizaciones, R⁹ es alquilo C₁₁. En aún otras realizaciones, R⁹ es alquilo C₁₂.

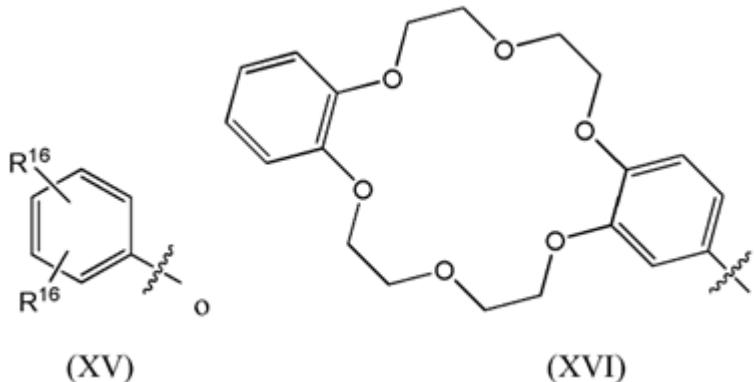
45 En algunas otras realizaciones, R⁹ es aralquilo C₁-C₁₂. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁹ es bencilo y el bencilo puede estar opcionalmente sustituido en el anillo de fenilo o en el carbono bencílico. Los sustituyentes a este respecto incluyen grupos alquilo y alcoxi, por ejemplo, metilo o metoxi. En algunas realizaciones, el grupo bencilo está sustituido con metilo en el carbono bencílico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁹ tiene la siguiente estructura (XIV):



(XIV)

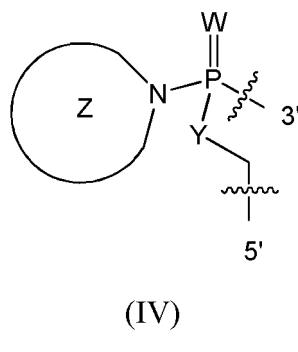
En otras realizaciones, R⁹ es arilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R⁹ es fenilo y el fenilo puede estar opcionalmente sustituido. Los sustituyentes en este sentido incluyen grupos alquilo y alcoxi, por ejemplo metilo o metoxi. En otras realizaciones, R⁹ es fenilo y el fenilo comprende un resto de éter corona, por ejemplo, un éter corona de 12 a 18 miembros. En una realización, el éter corona tiene 18 miembros y puede comprender además un resto fenilo adicional.

5 Por ejemplo, en una realización, R^9 tiene una de las siguientes estructuras (XV) o XVI):

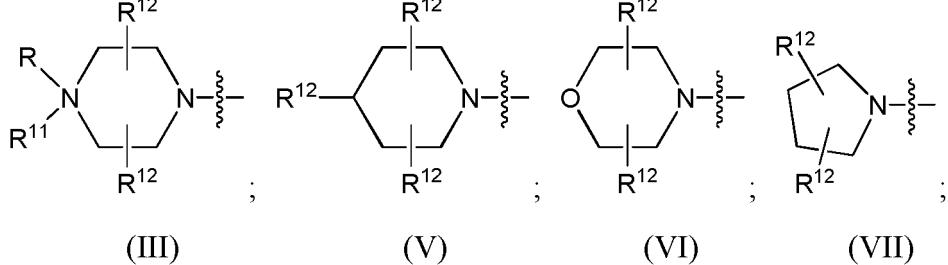


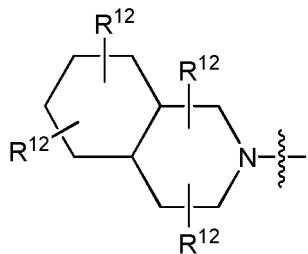
10 En algunas realizaciones, R^{10} es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂ o -LNR⁴R⁵R⁷, donde R⁴, R⁵ y R⁷ son como se definen anteriormente con respecto al enlace (A). En otras realizaciones, R^{10} es hidrógeno. En otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₁-C₁₂ y en otras realizaciones R^{10} es -LNR⁴R⁵R⁷. En algunas realizaciones, R^{10} es metilo. En aún otras realizaciones, R^{10} es etilo. En algunas realizaciones, R^{10} es alquilo C₃. En algunas realizaciones, R^{10} es alquilo C₄. En aún otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₅. En algunas otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₆. En otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₇. En aún otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₈. En algunas realizaciones, R^{10} es alquilo C₉. En otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₁₀. En aún otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₁₁. En algunas otras realizaciones, R^{10} es alquilo C₁₂.

En algunas realizaciones, R⁸ y R⁹ se unen para formar un heterociclo mono o bicíclico de 5-18 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclo es un heterociclo monocíclico de 5 ó 6 miembros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el enlace (B) tiene la siguiente estructura (IV):



En otras realizaciones, el heterocírculo es bicíclico, por ejemplo, un heterocírculo bicíclico de 12 miembros. El heterocírculo puede ser piperizinilo. El heterocírculo puede ser morfolino. El heterocírculo puede ser piperidinilo. El heterocírculo puede ser decahidroisoquinolina. Los heterocírculos representativos incluyen los siguientes:





(VIII)

En algunas realizaciones, R¹¹ es, cada vez que aparece, independientemente alquilo C₂-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, arilo, heteroarilo o heterociclico.

5 En algunas realizaciones, R¹¹ es alquilo C₂-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹¹ es etilo. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₃. En aún otras realizaciones, R¹¹ es isopropilo. En algunas otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₄. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R¹¹ es alquilo C₆. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₇. En 10 algunas realizaciones, R¹¹ es alquilo C₈. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₉. En aún otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₁₀. En algunas otras realizaciones, R¹¹ es alquilo C₁₁. En algunas realizaciones, R¹¹ es alquilo C₁₂.

15 En otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹¹ es metilamino. En algunas realizaciones, R¹¹ es etilamino. En otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₃. En aún otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₄. En 20 algunas otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₅. En otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₆. En aún otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₇. En algunas realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₈. En otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₉. En aún otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₁₀. En 25 algunas otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₁₁. En otras realizaciones, R¹¹ es aminoalquilo C₁₂.

20 En otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₁-C₁₂. En aún otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₁. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₂. En algunas realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₃. En aún otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₄. En algunas realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₅. En algunas otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₆. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₇. En aún otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₈. En 25 algunas realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₉. En aún otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₁₀. En algunas otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₁₁. En otras realizaciones, R¹¹ es alquilcarbonilo C₁₂. En aún otras realizaciones, R¹¹ es -C(=O)(CH₂)_nCO₂H, donde n es 1 a 6. Por ejemplo, en algunas realizaciones, n es 1. En otras realizaciones, n es 2. En aún otras realizaciones, n es 3. En algunas otras realizaciones, n es 4. En aún otras realizaciones, n es 5. En otras realizaciones, n es 6.

30 En otras realizaciones, R¹¹ es arilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R¹¹ es fenilo. En algunas realizaciones, el fenilo está sustituido, por ejemplo, con un grupo nitró.

En otras realizaciones, R¹¹ es heteroarilo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R¹¹ es piridinilo. En otras realizaciones, R¹¹ es pirimidinilo.

35 En otras realizaciones, R¹¹ es heterociclico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R¹¹ es piperidinilo, por ejemplo, piperidin-4-ilo.

En algunas realizaciones, R¹¹ es etilo, isopropilo, piperidinilo, pirimidinilo, colato, desoxicolato o -C(=O)(CH₂)_nCO₂H, donde n es 1 a 6.

40 En algunas realizaciones, R es un par de electrones. En otras realizaciones, R es hidrógeno y en otras realizaciones, R es alquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R es metilo. En algunas realizaciones, R es etilo. En otras realizaciones, R es C₃ alquilo. En aún otras realizaciones, R es isopropilo. En algunas otras realizaciones, R es alquilo C₄. En aún otras realizaciones, R es alquilo C₅. En algunas realizaciones, R es alquilo C₆. En otras realizaciones, R es alquilo C₇. En aún 45 otras realizaciones, R es alquilo C₈. En otras realizaciones, R es alquilo C₉. En algunas realizaciones, R es alquilo C₁₀. En aún otras realizaciones, R es C₁₁ alquilo. En algunas realizaciones, R es alquilo C₁₂.

50 En algunas realizaciones, R¹² es, cada vez que aparece, independientemente, hidrógeno, alquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂, -NH₂, -NR¹³R¹⁴, -NR¹³R¹⁴R¹⁵, oxo, -CN, trifluorometilo, amidilo, amidinilo, amidinilalquilo, amidinilalquilcarbonilo, guanidinilo, guanidinilalquilo, guanidinilalquilcarbonilo, colato, desoxicolato, arilo, heteroarilo, heterociclo, -SR¹³ o alcoxi C₁-C₁₂, donde R¹³, R¹⁴ y R¹⁵ son, cada vez que aparecen, independientemente alquilo C₁-C₁₂

55 En algunas realizaciones, R¹² es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹² es alquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹² es aminoalquilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹² es -NH₂. En algunas realizaciones, R¹² es -NR¹³R¹⁴. En algunas realizaciones, R¹² es -NR¹³R¹⁴R¹⁵. En algunas realizaciones, R¹² es alquilcarbonilo C₁-C₁₂. En algunas realizaciones, R¹²

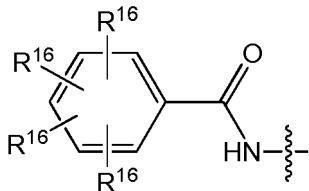
5 es oxo. En algunas realizaciones, R^{12} es $-CN$. En algunas realizaciones, R^{12} es trifluorometilo. En algunas realizaciones, R^{12} es amidilo. En algunas realizaciones, R^{12} es amidinilo. En algunas realizaciones, R^{12} es amidinilalquilo. En algunas realizaciones, R^{12} es amidinilalquilcarbonilo. En algunas realizaciones, R^{12} es guanidinilo, por ejemplo, monometilguanidinilo o dimetilguanidinilo. En algunas realizaciones, R^{12} es guanidinilalquilo. En algunas realizaciones, R^{12} es amidinilalquilcarbonilo. En algunas realizaciones, R^{12} es colato. En algunas realizaciones, R^{12} es desoxicolato. En algunas realizaciones, R^{12} es arilo. En algunas realizaciones, R^{12} es heteroarilo. En algunas realizaciones, R^{12} es heterociclo. En algunas realizaciones, R^{12} es $-SR^{13}$. En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_1-C_{12} . En algunas realizaciones, R^{12} es dimetilamina.

10 10 En otras realizaciones, R^{12} es metilo. En aún otras realizaciones, R^{12} es etilo. En algunas realizaciones, R^{12} es C_3 alquilo. En algunas realizaciones, R^{12} es isopropilo. En algunas realizaciones, R^{12} es alquilo C_4 . En otras realizaciones, R^{12} es alquilo C_5 . En aún otras realizaciones, R^{12} es alquilo C_6 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es alquilo C_7 . En algunas realizaciones, R^{12} es alquilo C_8 . En aún otras realizaciones, R^{12} es alquilo C_9 . En algunas realizaciones, R^{12} es alquilo C_{10} . En aún otras realizaciones, R^{12} es alquilo C_{11} . En otras realizaciones, R^{12} es alquilo C_{12} . En aún otras realizaciones, el resto alquilo se sustituye con uno o más átomos de oxígeno para formar un resto éter, por ejemplo, un resto metoximetilo.

20 15 En algunas realizaciones, R^{12} es metilamino. En otras realizaciones, R^{12} es etilamino. En aún otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_3 . En algunas realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_4 . En aún otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_6 . En algunas realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_7 . En algunas realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_8 . En aún otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_9 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_{10} . En aún otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_{11} . En otras realizaciones, R^{12} es aminoalquilo C_{12} . En algunas realizaciones, el aminoalquilo es un dimetilaminoalquilo.

25 30 En aún otras realizaciones, R^{12} es acetilo. En algunas otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_2 . En algunas realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_3 . En aún otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_4 . En algunas realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_5 . En aún otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_6 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_7 . En algunas realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_8 . En aún otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_9 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_{10} . En algunas realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C_{11} . En otras realizaciones, R^{12} es C_{12} alquilcarbonilo. El alquilcarbonilo se sustituye con un resto carboxi, por ejemplo, el alquilcarbonilo se sustituye para formar un resto de ácido succínico (es decir, un 3-carboxialquilcarbonilo). En otras realizaciones, el alquilcarbonilo está sustituido con un grupo $-SH$ terminal.

35 En algunas realizaciones, R^{12} es amidilo. En algunas realizaciones, el amidilo comprende un resto alquilo que está además sustituido, por ejemplo, con $-SH$, carbamato o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones, el amidilo se sustituye con un resto arilo, por ejemplo, fenilo. En ciertas realizaciones, R^{12} puede tener la siguiente estructura (IX):



(IX)

40 donde R^{16} es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, alquilo C_1-C_2 , alcoxi C_1-C_2 , $-CN$, arilo o heteroarilo.

45 En algunas realizaciones, R^{12} es metoxi. En otras realizaciones, R^{12} es etoxi. En aún otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_3 . En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_4 . En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_6 . En otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_7 . En algunas otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_5 . En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_9 . En otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_{10} . En algunas realizaciones, R^{12} es alcoxi C_{11} . En aún otras realizaciones, R^{12} es alcoxi C_{12} .

50 En ciertas realizaciones, R^{12} es pirrolidinilo, por ejemplo, pirrolidin-1-ilo. En otras realizaciones, R^{12} es piperidinilo, por ejemplo, piperidin-1-ilo o piperidin-4-ilo. En otra realización, R^{12} es morfolino, por ejemplo, morfolin-4-ilo. En otras realizaciones, R^{12} es fenilo, e incluso en realizaciones adicionales, el fenilo está sustituido, por ejemplo, con un grupo nitró. En aún otras realizaciones, R^{12} es pirimidinilo, por ejemplo, pirimidin-2-ilo.

55 En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} y R^{15} son, cada vez que aparecen, independientemente alquilo C_1-C_2 . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es metilo. En aún otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es etilo. En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_3 . En aún otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es isopropilo. En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_4 . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_5 . En algunas otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_6 . En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_7 . En aún otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_5 . En otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_9 . En algunas realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C_{10} . En algunas realizaciones,

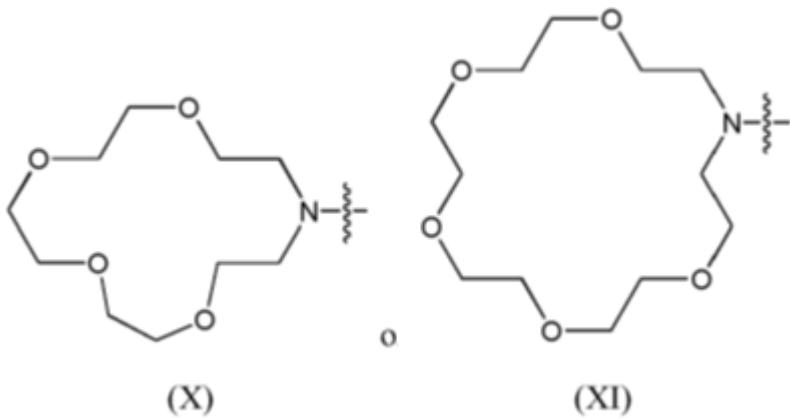
R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C₁₁. En aún otras realizaciones, R^{13} , R^{14} o R^{15} es alquilo C₁₂.

Como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, R^{12} es amidilo sustituido con un resto arilo. En este sentido, cada ocurrencia de R^{16} puede ser igual o diferente. En algunas de estas realizaciones, R^{16} es hidrógeno. En otras realizaciones, R^{16} es -CN. En otras realizaciones, R^{16} es heteroarilo, por ejemplo, tretrazolilo. En ciertas otras realizaciones, R^{16} es metoxi. En otras realizaciones, R^{16} es arilo y el arilo está opcionalmente sustituido. Los sustitutos opcionales a este respecto incluyen: alquilo C₁-C₂, alcoxi C₁-C₂, por ejemplo, metoxi; trifluorometoxi; halo, por ejemplo cloro; y trifluorometilo.

10 En otras realizaciones, R^{16} es metilo. En aún otras realizaciones, R^{16} es etilo. En algunas realizaciones, R^{16} es alquilo C₃. En algunas otras realizaciones, R^{16} es isopropilo. En aún otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₄. En otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₅. En aún otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₆. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₇. En algunas realizaciones, R^{16} es alquilo C₈. En aún otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₉. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₁₀. En otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₁₁. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alquilo C₁₂.

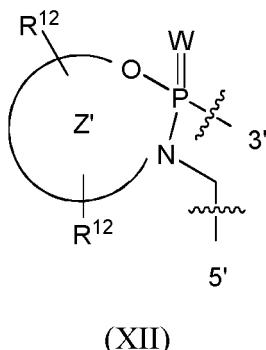
15 En algunas realizaciones, R^{16} es metoxi. En algunas realizaciones, R^{16} es etoxi. En aún otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₃. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₄. En otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₅. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₆. En aún otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₇. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₈. En aún otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₉. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₁₀. En algunas realizaciones, R^{16} es alcoxi C₁₁. En algunas otras realizaciones, R^{16} es alcoxi C₁₂.

20 En algunas otras realizaciones, R^8 y R^9 se unen para formar un éter corona de 12 a 18 miembros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el éter corona tiene 18 miembros, y en otras realizaciones el éter corona tiene 15 miembros. En ciertas realizaciones, R^8 y R^9 se unen para formar un heterociclo que tiene una de las siguientes estructuras (X) o (XI):

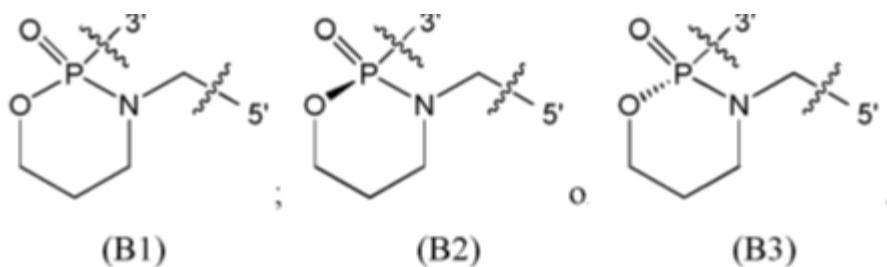


25

30 En algunas realizaciones, R^8 , R^9 o R^3 se unen con R^{10} para formar un heterociclo de 5 a 7 miembros. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^3 se une a R^{10} para formar un heterociclo de 5 a 7 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclo tiene 5 miembros. En otras realizaciones, el heterociclo tiene 6 miembros. En otras realizaciones, el heterociclo es de 7 miembros. En algunas realizaciones, el heterociclo está representado por la siguiente estructura (XII):



35 donde Z' representa un heterociclo de 5-7 miembros. En ciertas realizaciones de la estructura (XI), R¹² es hidrógeno cada vez que aparece. Por ejemplo, el enlace (B) puede tener una de las siguientes estructuras (B1), (B2) o (B3):



En ciertas otras realizaciones, R^{12} es alquilcarbonilo C₁-C₂ o amidilo que está además sustituido con un resto aril-fosforilo, por ejemplo, un resto trifenilfosforilo. Los ejemplos de enlaces que tienen esta estructura incluyen B56 y B55.

5

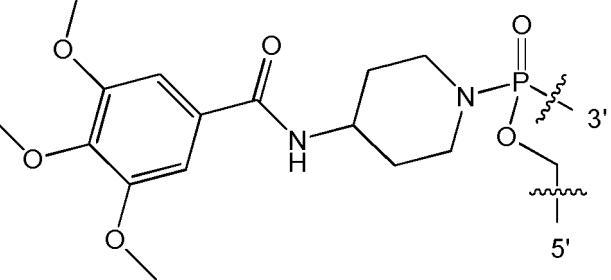
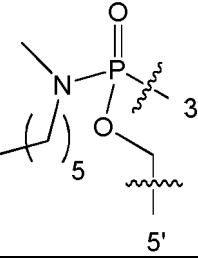
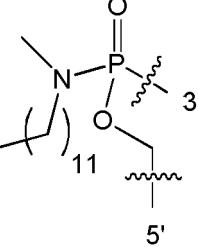
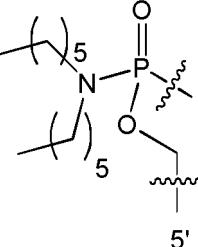
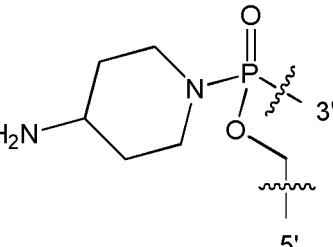
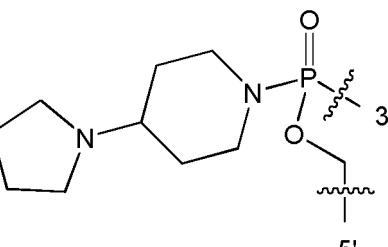
En cierta realización, el enlace (B) no tiene ninguna de las estructuras A1-A5. La Tabla 3 muestra enlaces representativos de tipo (A) y (B).

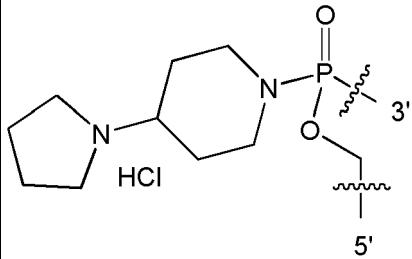
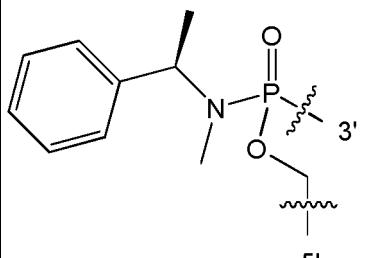
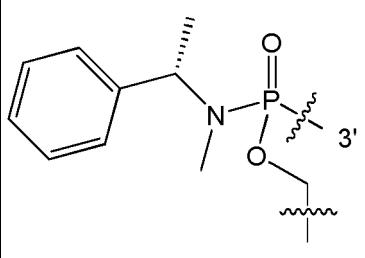
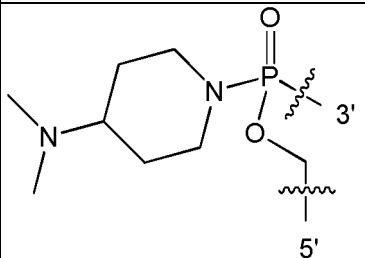
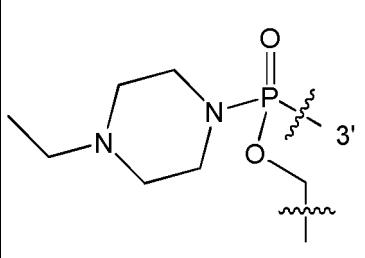
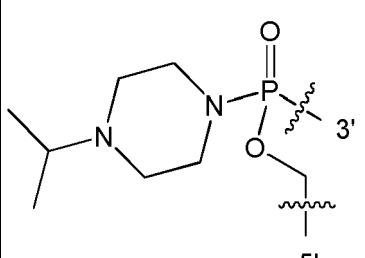
Tabla 3. Enlaces representativos entre subunidades

10

No.	Nombre	Estructura
A1	PMO	
A2	PMO ⁺ (forma no protonada representada)	
A3	PMO ⁺ (+)	
A4	PMo ^{mepip} (m+)	

No.	Nombre	Estructura
A5	PMO ^{GU} X	
B1	PMO ^{cp}	
B2	PMO ^{cps}	
B3	PMO ^{cpr}	
B4	PMO ^{Shc}	
B5	PMO ^{morfolino (m)}	

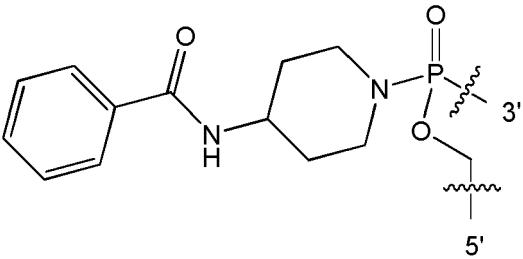
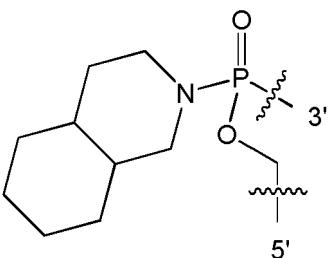
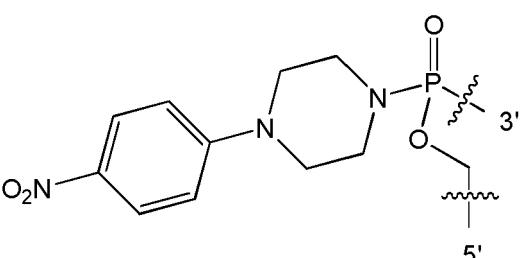
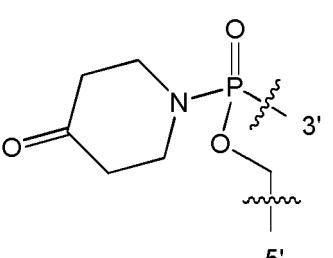
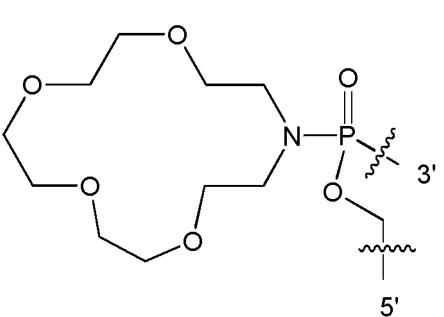
No.	Nombre	Estructura
B6	PMO ^{tri} (t)	
B7	PMO ^{hex} (h)	
B8	PMO ^{dodec}	
B9	PMO ^{dihex}	
B10	PMO ^{apn} (a)	
B11	PMO ^{pir} (p)	

No.	Nombre	Estructura
B12	PMO ^{pir} (sal HCl)	
B13	PMO ^{rba}	
B14	PMO ^{sba}	
B15	PMO ^{dimetilapn}	
B16	PMO ^{etpip}	
B17	PMO ^{iprpip}	

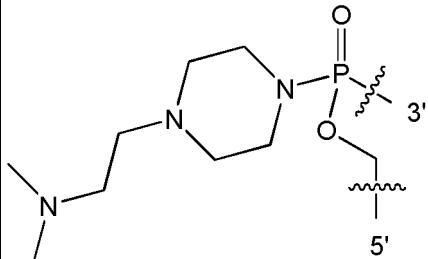
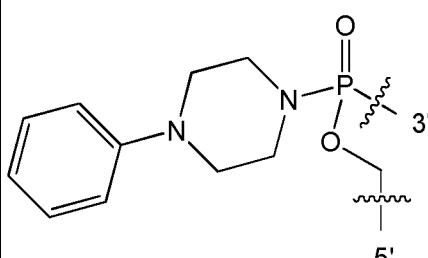
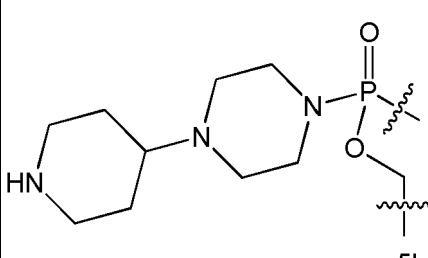
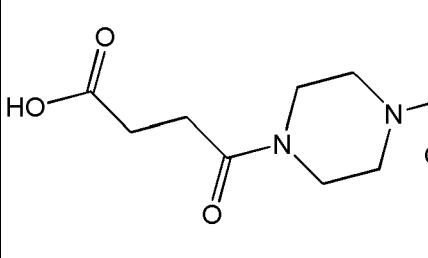
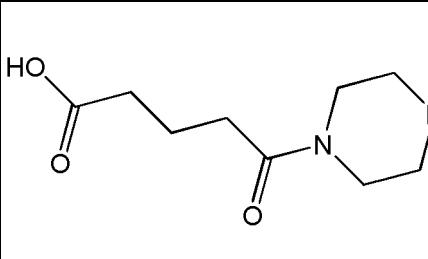
No.	Nombre	Estructura
B18	PMO ^{pirQMe}	
B19	PMO ^{cb}	
B20	PMO ^{ma}	
B21	PMO ^{bu}	
B22	PMO ^{bi}	

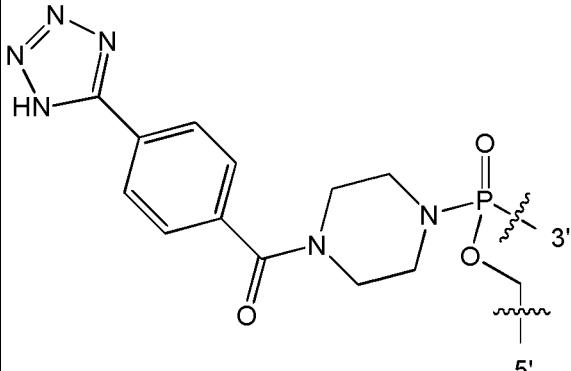
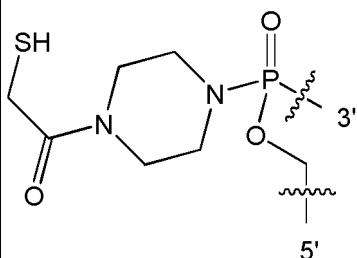
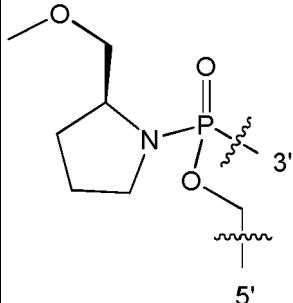
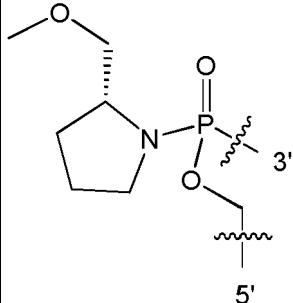
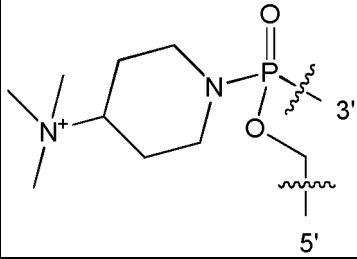
No.	Nombre	Estructura
B23	PMO ^{pip}	
B24	PMO ^{odmb}	
B25	PMO ^{tfb}	
B26	PMO ^{etfb}	
B27	PMO ^{ptfb}	

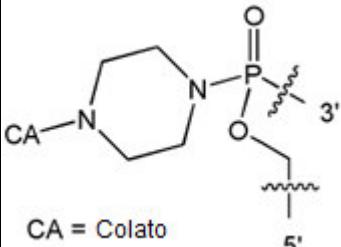
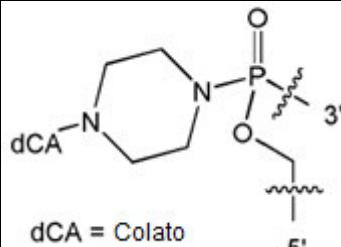
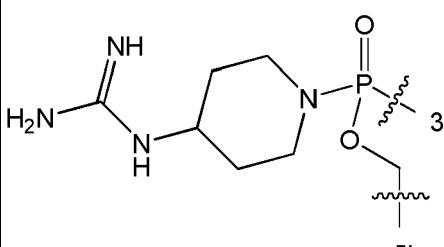
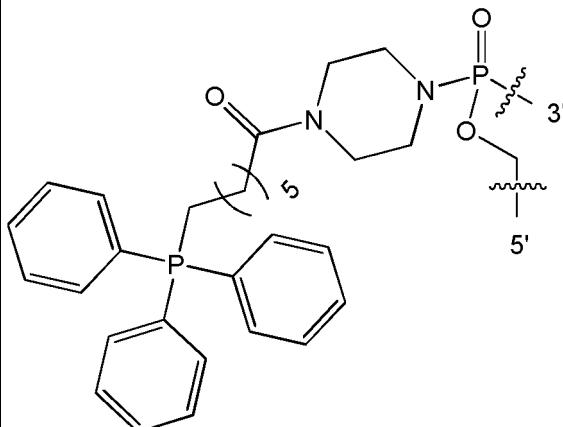
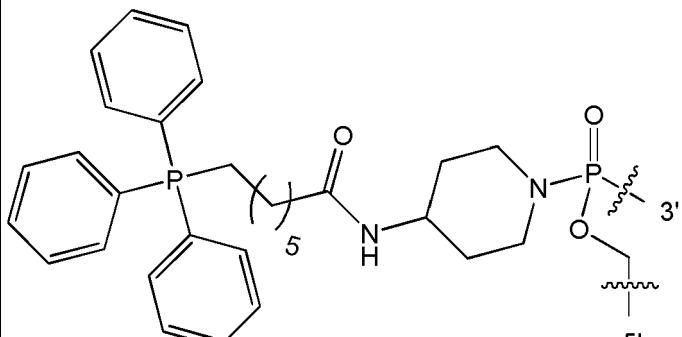
No.	Nombre	Estructura
B28	PMO ^{dcb}	
B29	PMO ^{dmdb}	
B30	PMO ^{hy}	
B31	PMO ^{6ce}	

No.	Nombre	Estructura
B32	PMO ^b	
B33	PMO ^q	
B34	PMO ^{npp}	
B35	PMO ^o	
B36	PMO ^{4ce}	

No.	Nombre	Estructura
B37	PMO ^{5ce}	
B38	PMO ^{f3p}	
B39	PMO ^{cip}	
B40	PMO ^{mop}	
B41	PMO ^{pp}	

No.	Nombre	Estructura
B42	PMO ^{dmePIP}	
B43	PMO ^{NPPIP}	
B44	PMO ^{bipPIP}	
B45	PMO ^{suc}	
46	PMO ^{glutárico}	

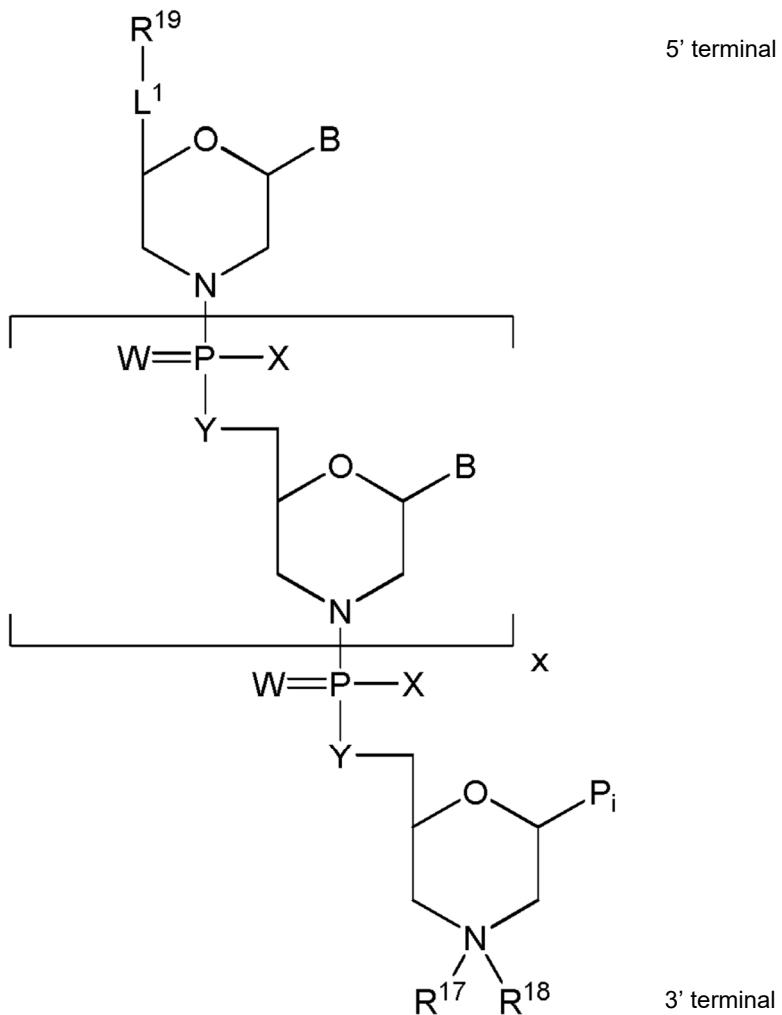
No.	Nombre	Estructura
B47	PMO ^{tet}	
B48	PMO ^{tiol (SH)}	
B49	PMO ^{pros}	
B50	PMO ^{pror}	
B51	PMO ^{trne}	

No.	Nombre	Estructura
B52	PMO ^{ca}	 <p>CA = Colato</p>
B53	PMO ^{dca}	 <p>dCA = Colato</p>
B54	PMO ^{guan (g)}	
B55	PMO ^{+fós}	
B56	PMO ^{apnfos}	

En las secuencias y la discusión que sigue, a menudo se usan los nombres anteriores para los enlaces. Por ejemplo, una base que comprende un enlace PMO^{apn} se ilustra como ^{apn}B, donde B es una base. Otros enlaces se designan de manera

similar. Además, se pueden usar designaciones abreviadas, por ejemplo, se pueden usar las designaciones abreviadas entre paréntesis anteriores (por ejemplo, ^aB, se refiere a ^{apn}B). También se pueden utilizar otras abreviaturas fácilmente identificables.

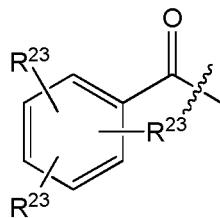
- 5 Como se indicó anteriormente, la presente divulgación también proporciona un oligómero que comprende grupos terminales modificados. Los solicitantes han descubierto que la modificación del extremo 3' y/o 5' del oligómero con varios restos químicos proporciona propiedades terapéuticas beneficiosas (por ejemplo, suministro celular mejorado, potencia y/o distribución tisular, etc.) a los oligómeros. En varias realizaciones, los grupos terminales modificados comprenden un resto hidrófobo, mientras que en otras realizaciones los grupos terminales modificados comprenden un resto hidrófilo. Los 10 grupos terminales modificados pueden estar presentes con o sin los enlaces descritos anteriormente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligómeros comprenden uno o más grupos terminales modificados y enlaces de tipo (A), por ejemplo, enlaces donde X es $-N(CH_3)_2$. En otras realizaciones, los oligómeros comprenden uno o más grupos terminales modificados y enlaces de tipo (B), por ejemplo, enlaces donde X es 4-aminopiperidin-1-ilo (es decir, APN). En aún otras 15 realizaciones, los oligómeros comprenden uno o más grupos terminales modificados y una mezcla de enlaces (A) y (B). Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender uno o más grupos terminales modificados (por ejemplo, tritilo o trifenilacetilo) y enlaces donde X es $-N(CH_3)_2$ y enlaces donde X es 4-aminopiperidin-1-ilo. Otras combinaciones de grupos terminales modificados y enlaces modificados también proporcionan propiedades terapéuticas favorables a los oligómeros.
- 20 En una realización, los oligómeros que comprenden modificaciones terminales tienen la siguiente estructura (XVII):



- 25 o una de sus sales o isómeros, donde X, W e Y son como se definen anteriormente para cualquiera de los enlaces (A) y (B) y:

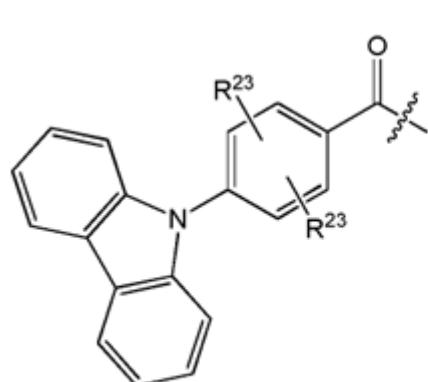
- R¹⁷ está, cada vez que aparece, independientemente ausente, hidrógeno o alquilo C₁-C₆; R¹⁸ y R¹⁹ son, en cada caso, independientemente ausentes, hidrógeno, un péptido de penetración celular, un aminoácido natural o no natural, alquilcarbonilo C₂-C₃₀, -C(=O)OR²¹ o R²⁰;
- R²⁰ es, cada vez que aparece, independientemente guanidinilo, heterociclico, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, arilo C₈-C₃₀ alquiloxicarbonilo, o -P(=O)(R²²)₂;
- B es un resto de apareamiento de bases;
- L¹ es un conector opcional de hasta 18 átomos de longitud que comprende enlaces seleccionados de alquilo, hidroxilo, alcoxi, alquilamino, amida, éster, carbonilo, carbamato, fosforodiamidato, fosforoamidato, fosforotioato, piperazina y fosfodiéster; y
- x es un número entero de 0 o mayor; y donde al menos uno de R¹⁸ o R¹⁹ es R²⁰; y en donde al menos uno de R¹⁸ o R¹⁹ es R²⁰ y siempre que R¹⁷ y R¹⁸ no estén ausentes.
- 15 Los oligómeros con grupos terminales modificados pueden comprender cualquier número de enlaces de tipo (A) y (B). Por ejemplo, los oligómeros pueden comprender solo el tipo de enlace (A). Por ejemplo, X en cada enlace puede ser -N(CH₃)₂. Alternativamente, los oligómeros solo pueden comprender el enlace (B). En determinadas realizaciones, los oligómeros comprenden una mezcla de enlaces y (B), por ejemplo, de 1 a 4 enlaces de tipo (B) y el resto de los enlaces son de tipo (A). Los enlaces a este respecto incluyen, pero no se limitan a, enlaces donde X es aminopiperidinilo para el tipo (B) y dimetilamino para el tipo (A).
- 20 En algunas realizaciones, R¹⁷ está ausente. En algunas realizaciones, R¹⁷ es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹⁷ es alquilo C₁-C₆. En algunas realizaciones, R¹⁷ es metilo. En aún otras realizaciones, R¹⁷ es etilo. En algunas realizaciones, R¹⁷ es alquilo C₃. En algunas otras realizaciones, R¹⁷ es isopropilo. En otras realizaciones, R¹⁷ es alquilo C₄. En aún otras realizaciones, R¹⁷ es alquilo C₅. En algunas otras realizaciones, R¹⁷ es alquilo C₆.
- 25 En otras realizaciones, R¹⁸ está ausente. En algunas realizaciones, R¹⁸ es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹⁸ es un péptido de penetración celular como se describe con más detalle a continuación. En algunas realizaciones, R¹⁸ es un aminoácido natural o no natural, por ejemplo, trimetilglicina. En algunas realizaciones, R¹⁸ es R²⁰.
- 30 En otras realizaciones, R¹⁹ está ausente. En algunas realizaciones, R¹⁹ es hidrógeno. En algunas realizaciones, R¹⁹ es un péptido de penetración celular como se describe con más detalle a continuación. En algunas realizaciones, R¹⁹ es un aminoácido natural o no natural, por ejemplo, trimetilglicina. En algunas realizaciones, R¹⁹ es -C(=O)OR¹⁷, por ejemplo, R¹⁹ puede tener la siguiente estructura:
- 35
- En otras realizaciones, R¹⁸ o R¹⁹ es alquilcarbonilo C₂-C₃₀, por ejemplo -C(=O)(CH₂)_nCPO₂H, donde n es 1 a 6, por ejemplo 2. En otros ejemplos, R¹⁸ o R¹⁹ es acetilo.
- 40 En algunas realizaciones, R²⁰ es, cada vez que aparece, independientemente guanidinilo, heterociclico, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₆-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀, -C(=O)OR²¹ o -P(=O)(R²²)₂, donde R²¹ es alquilo C₁-C₃₀ que comprende uno o más restos de oxígeno o hidroxilo o combinaciones de los mismos y cada R²² es C⁶-C¹² ariloxi.
- 45 En ciertas otras realizaciones, R¹⁹ es -C(=O)OR²¹ y R¹⁸ es hidrógeno, guanidinilo, heterociclico, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀, o -P(=O)(R²²)₂, donde cada R²² es ariloxi C⁶-C¹².
- 50 En otras realizaciones, R²⁰ es, cada vez que aparece, independientemente guanidinilo, heterociclico, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, alquilcarbonilo C₃-C₃₀, cicloalquilcarbonilo C₃-C₈, cicloalquilalquilcarbonilo C₃-C₈, arilcarbonilo C₇-C₃₀, aralquilcarbonilo C₇-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀, o -P(=O)(R²²)₂. Mientras que en otros ejemplos, R²⁰ es, cada vez que aparece, independientemente guanidinilo, heterociclico, alquilo C₁-C₃₀, cicloalquilo C₃-C₈; arilo C₆-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₂-C₃₀, cicloalquiloxicarbonilo C₃-C₈, ariloxicarbonilo C₇-C₃₀, aralquiloxicarbonilo C₈-C₃₀ aralquiloxicarbonilo, o -P(=O)(R¹²)₂.
- 55 En algunas realizaciones, R²⁰ es guanidinilo, por ejemplo, monometilguanidinilo o dimetilguanidinilo. En otras realizaciones, R²⁰ es heterociclico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R²⁰ es piperidin-4-ilo. En algunas realizaciones, el piperidin-4-ilo está sustituido con grupos trítilo o Boc. En otras realizaciones, R²⁰ es cicloalquilo C₃-C₈. En otras realizaciones, R²⁰ es arilo C₆-C₃₀.

En algunas realizaciones, R^{20} es arilcarbonilo C₇-C₃₀. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} tiene la siguiente estructura (XVIII):

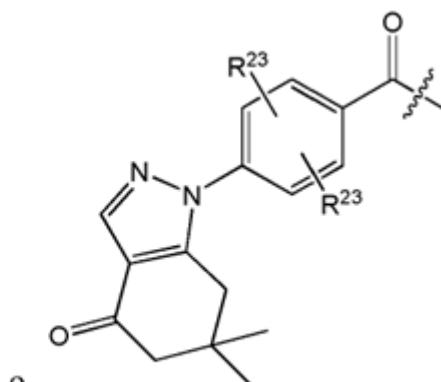


5 (XVIII)

10 donde R^{23} es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₃₀, alcoxi C₁-C₃₀, alquilogcarbonilo C₁-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, arilo, heteroarilo, heterociclico o heterocicloalquilo, y donde un R^{23} puede unirse a otro R^{23} para formar un anillo de heterociclico. En algunas realizaciones, al menos un R^{23} es hidrógeno, por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R^{23} es hidrógeno. En otras realizaciones, al menos un R^{23} es alcoxi C₁-C₃₀, por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R^{23} es metoxi. En otras realizaciones, al menos un R^{23} es heteroarilo, por ejemplo, en algunas realizaciones, al menos un R^{23} tiene una de las siguientes estructuras (XVIIIa) de (XVIIIb):



15 (XVIIIa)

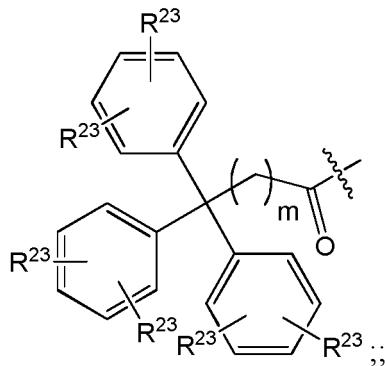


(XVIIIb)

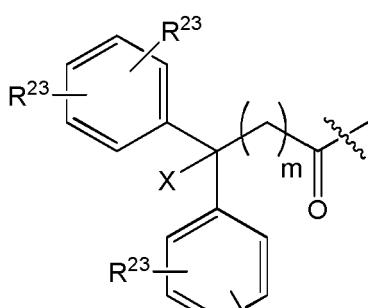
15

En aún otras realizaciones, un R^{23} se une con otro R^{23} para formar un anillo de heterociclico. Por ejemplo, en una realización, R^{20} es 5-carboxifluoresceína.

20 En otras realizaciones, R^{20} es aralquilcarbonilo C₇-C₃₀. Por ejemplo, en varias realizaciones, R^{20} tiene una de las siguientes estructuras (XIX), (XX) o (XXI):

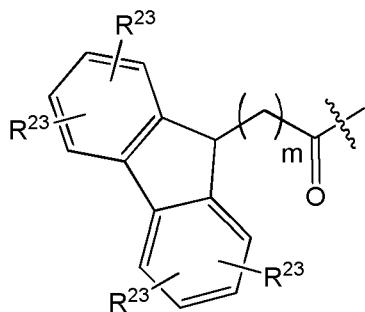


(XIX)



(XX)

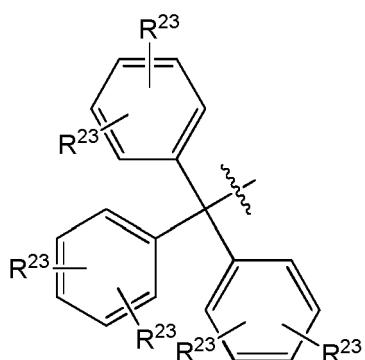
25



(XXI)

5 donde R²³ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₃₀, alcoxi C₁-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₁-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, arilo, heteroarilo, heterociclico o heterocicloalquilo, donde un R²³ puede unirse con otro R²³ para forman un anillo de heterociclico, X es -OH o halo y m es un número entero de 0 a 6. En algunas realizaciones específicas, m es 0. En otras realizaciones, m es 1, mientras que, en otras realizaciones, m es 2. En otras realizaciones, al menos un R²³ es hidrógeno, por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R²³ es hidrógeno. En algunas realizaciones, X es hidrógeno. En otras realizaciones, X es -OH. En otras realizaciones, X es Cl. En otras realizaciones, al menos un R²³ es alcoxi C₁-C₃₀, por ejemplo, metoxi.

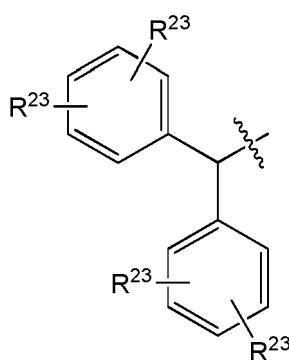
10 10 En aún otras realizaciones, R²⁰ es aralquilo C₇-C₃₀, por ejemplo, tritilo. En otras realizaciones, R²⁰ es metoxitritilo. En algunas realizaciones, R²⁰ tiene la siguiente estructura (XXII):



(XXII)

15 15 donde R²³ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₃₀, alcoxi C₁-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₁-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, arilo, heteroarilo, heterociclico o heterocicloalquilo, y donde un R²³ puede unirse a otro R²³ para formar un anillo de heterociclico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, cada R²³ es hidrógeno. En otras realizaciones, al menos un R²³ es alcoxi C₁-C₃₀, por ejemplo, metoxi.

20 20 En aún otras realizaciones, R²⁰ es aralquilo C₇-C₃₀ y R²⁰ tiene la siguiente estructura (XXIII):

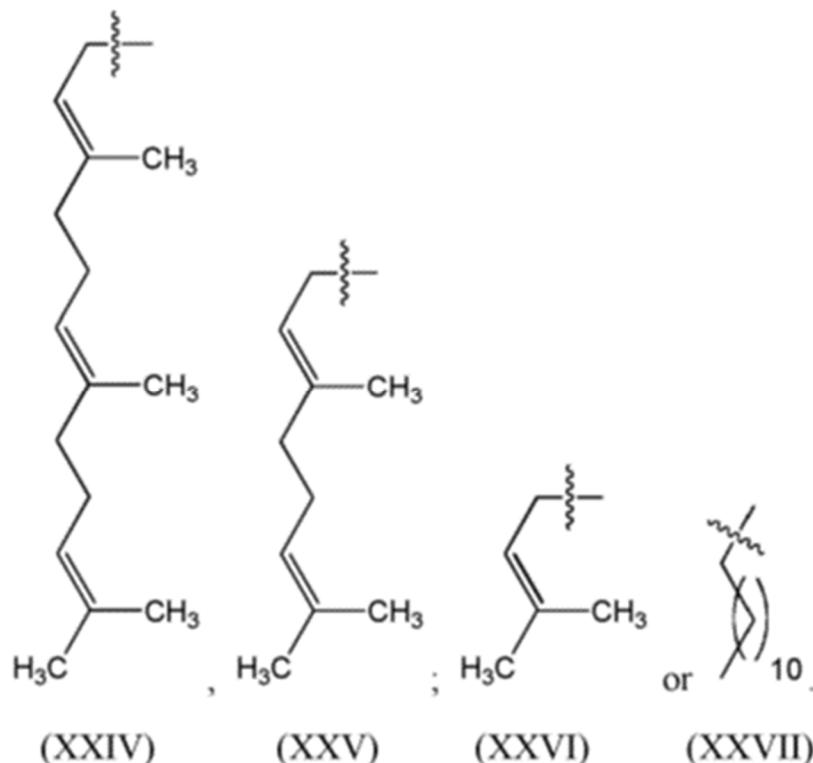


(XXIII)

25 25 En algunas realizaciones, al menos un R²³ es halo, por ejemplo, cloro. En algunas otras realizaciones, un R²³ es cloro en

la posición para.

5 En otras realizaciones, R^{20} es alquilo C₁-C₃₀. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} es un alquilo C₄-C₂₀ y opcionalmente comprende uno o más dobles enlaces. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} es un alquilo C₄-10 que comprende un triple enlace, por ejemplo, un triple enlace terminal. En algunas realizaciones, R^{20} es hexin-6-ilo. En algunas realizaciones, R^{20} tiene una de las siguientes estructuras (XXIV), (XXV), (XXVI) o (XXVII):

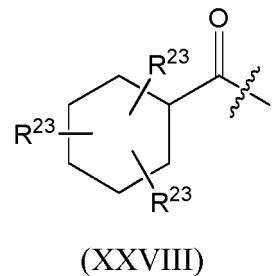


- 10 En aún otras realizaciones, R²⁰ es un alquilcarbonilo C₃-C₃₀, por ejemplo, un alquilcarbonilo C₃-C₁₀. En algunas realizaciones, R²⁰ es -C(=O)(CH₂)_pSH o -C(=O)(CH₂)_pSSHet, donde p es un número entero de 1 a 6 y Het es un heteroarilo. Por ejemplo, p puede ser 1 o p puede ser 2. En otro ejemplo Het es piridinilo, por ejemplo, piridin-2-ilo. En otras realizaciones, el alquilcarbonilo C₃-C₃₀ se sustituye con un oligómero adicional, por ejemplo, en algunas realizaciones, el oligómero comprende un carbonilo de alquilo C₃-C₃₀ en la posición 3' que une el oligómero a la posición 3' de otro oligómero. Dichas modificaciones de terminales están incluidas dentro del alcance de la presente divulgación.

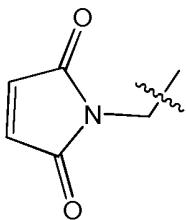
15

En otras realizaciones, R^{20} es un carbonilo de alquilo C_3 - C_{30} que está además sustituido con un resto arilfosforilo, por ejemplo, trifenilfosforilo. Los ejemplos de tales grupos R^{20} incluyen la estructura 33 en la Tabla 2.

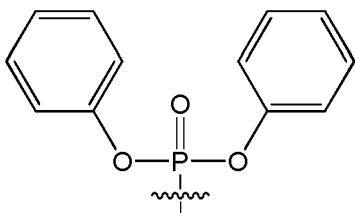
- 20 En otros ejemplos, R^{20} es cicloalquilcarbonilo C_3-C_8 , por ejemplo, alquilcarbonilo C_5-C_7 . En estas realizaciones, R^{20} tiene la siguiente estructura (XXVIII):



- 25 donde R^{23} es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₃₀, alcoxi C₁-C₃₀, alquiloxicarbonilo C₁-C₃₀, aralquilo C₇-C₃₀, arilo, heteroarilo, heterociclo o heterocicloalquilo, y donde un R^{23} puede unirse a otro R^{23} para formar un anillo de heterociclo. En algunas realizaciones, R^{23} es heterociclolalquilo, por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{23} tiene la siguiente estructura:



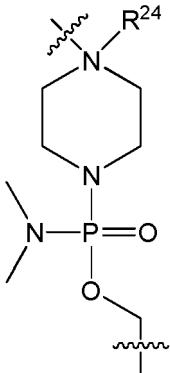
- En algunas otras realizaciones, R^{20} es cicloalquilalquilcarbonilo C_3-C_8 . En otras realizaciones, R^{20} es alquiloglicarbonilo C_2-C_{30} . En otras realizaciones, R^{20} es cicloalquiloglicarbonilo C_3-C_8 . En otras realizaciones, R^{20} es ariloxicarbonilo C_7-C_{30} .
 5 En otras realizaciones, R^{20} es aralquiloglicarbonilo C_8-C_{30} . En otras realizaciones, R^{20} es $-P(=O)(R^{22})_2$, donde cada R^{22} es ariloxi C_6-C^{12} , por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} tiene la siguiente estructura (C24):



(C24)

- 10 En otras realizaciones, R^{20} comprende uno o más átomos de halo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, R^{20} comprende un análogo de perfluoro de cualquiera de los restos de R^{20} anteriores. En otras realizaciones, R^{20} es p -trifluorometilfenilo, trifluorometiltrítilo, perfluoropentilo o pentafluorofenilo.
 15 En algunas realizaciones, el término 3' comprende una modificación y en otras realizaciones, el término 5' comprende una modificación. En otras realizaciones, tanto los extremos 3' como 5' comprenden modificaciones. En consecuencia, en algunas realizaciones, R^{18} está ausente y R^{19} es R^{20} . En otras realizaciones, R^{19} está ausente y R^{18} es R^{20} . En aún otras realizaciones, R^{18} y R^{19} son cada uno R^{20} .
 20 En algunas realizaciones, el oligómero comprende un péptido de penetración celular además de una modificación 3' o 5'. Por consiguiente, en algunas realizaciones, R^{19} es un péptido de penetración celular y R^{18} es R^{20} . En otras realizaciones, R^{18} es un péptido de penetración celular y R^{19} es R^{20} . En realizaciones adicionales de lo anterior, el péptido de penetración celular es un péptido rico en arginina.
 25 En algunas realizaciones, el conector L^1 que une el grupo terminal 5' (es decir, R^{19}) al oligómero puede estar presente o ausente. El enlazador comprende cualquier cantidad de grupos funcionales y longitudes siempre que el enlazador conserve su capacidad para unir el grupo terminal 5' al oligómero y siempre que el enlazador no interfiera con la capacidad del oligómero para unirse a una secuencia objetivo de una manera específica de secuencia. En una realización, L comprende enlaces fosforodiamidato y piperazina. Por ejemplo, en algunas realizaciones L tiene la siguiente estructura (XXIX):

30



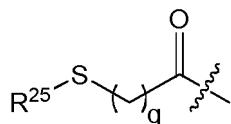
(XXIX)

- donde R^{24} está ausente, hidrógeno o alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, R^{24} está ausente. En algunas realizaciones, R^{24} es hidrógeno. En algunas realizaciones, R^{24} es alquilo C_1-C_6 . En algunas realizaciones, R^{24} es metilo. En otras realizaciones, R^{24} es etilo. En aún otras realizaciones, R^{24} es alquilo C_3 . En algunas otras realizaciones, R^{24} es isopropilo.
 35

En aún otras realizaciones, R²⁴ es alquilo C₄. En algunas realizaciones, R²⁴ es alquilo C₅. En aún otras realizaciones, R²⁴ es alquilo C₆.

En aún otras realizaciones, R²⁰ es alquilcarbonilo C₃-C₃₀, y R²⁰ tiene la siguiente estructura (XXX):

5



(XXX)

donde R²⁵ es hidrógeno o -SR²⁶, donde R²⁶ es hidrógeno, alquilo C₁-C₃₀, heterociclico, arilo o heteroarilo, y q es un número entero de 0 a 6.

10

En realizaciones adicionales de cualquiera de los anteriores, R²³ es, cada vez que aparece, independientemente hidrógeno, halo, alquilo C₁-C₃₀, alcoxi C₁-C₃₀, arilo, heteroarilo, heterociclico o heterocicloalquilo.

15

En algunas otras realizaciones, solo el extremo 3' del oligómero se conjuga con uno de los grupos indicados anteriormente.

15

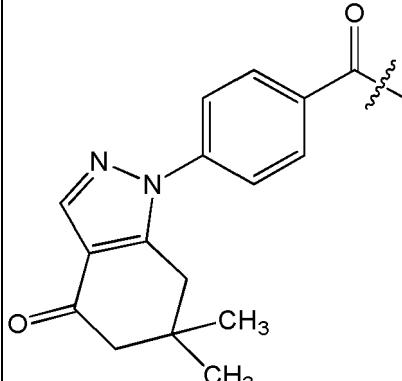
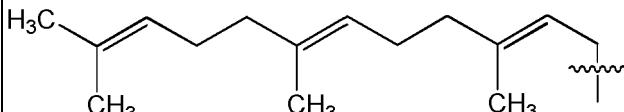
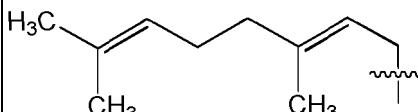
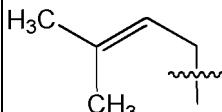
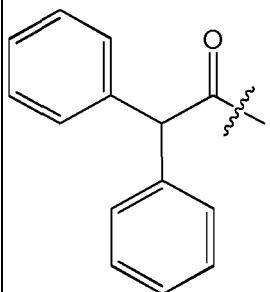
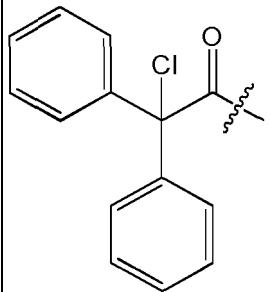
En algunas otras realizaciones, solo el extremo 5' del oligómero se conjuga con uno de los grupos indicados anteriormente.

En otras realizaciones, los extremos 3' y 5' comprenden uno de los grupos indicados anteriormente. El grupo terminal puede seleccionarse de cualquiera de los grupos mencionados anteriormente o cualquiera de los grupos específicos ilustrados en la Tabla 4.

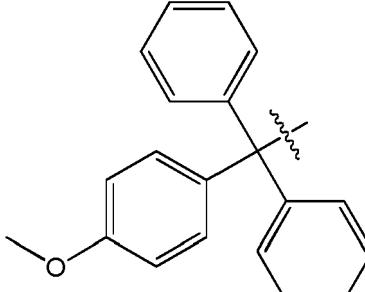
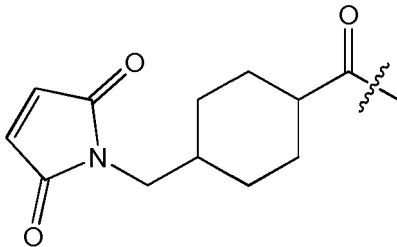
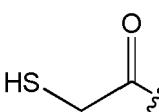
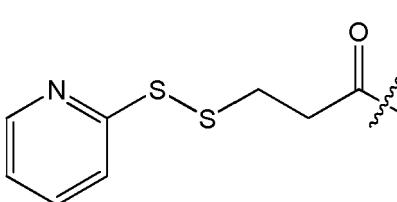
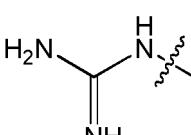
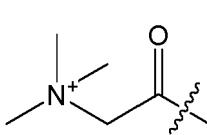
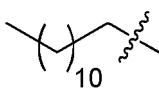
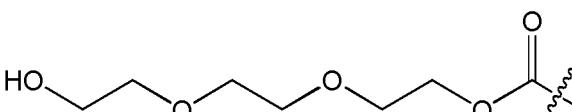
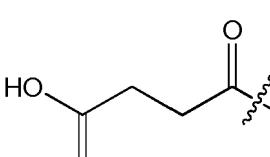
20

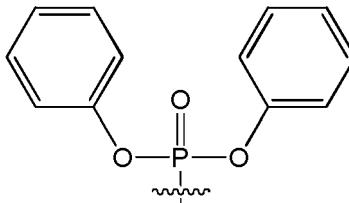
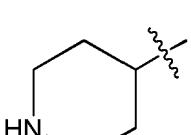
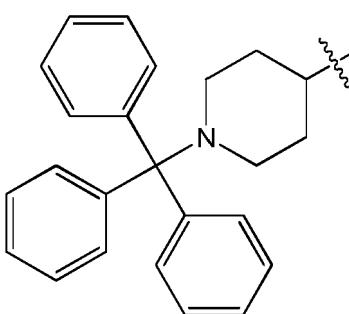
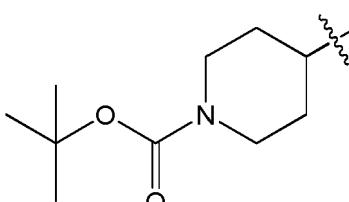
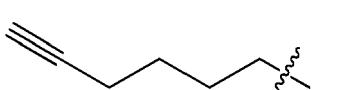
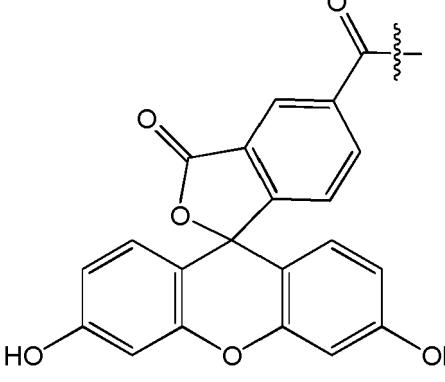
Tabla 4. Grupos de terminales representativos

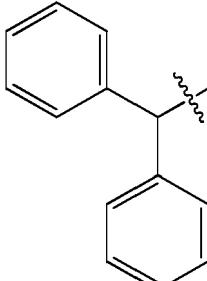
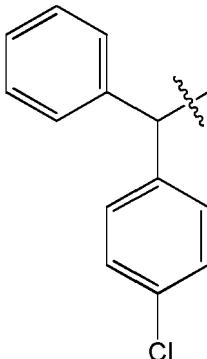
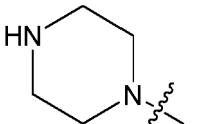
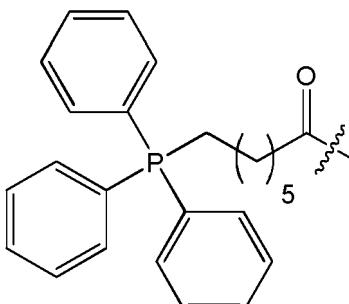
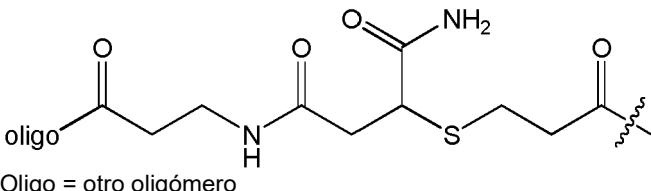
No.	Nombre	Estructura
C1	trimetoxibenzoilo	
C2	9-fluoreno-carboxilo	
C3	4-carbazolilbenzoilo	

No.	Nombre	Estructura
C4	4-indazolilonabenzoilo	
C5	Farnesilo	
C6	geranilo	
C7	Prenyl	
C8	difenilacetilo	
C9	clorodifenilacetilo	

No.	Nombre	Estructura
Q10	hidroxidifenilacetilo	
C11	trifenilpropionilo	
C12	trifenilpropilo	
C13	trifenilacetilo	
C14	Tritilo (Tr)	

No.	Nombre	Estructura
P15	Metoxitritilo (MeOTr)	
C16	Metilsuccinimidilciclohexoilo	
C17	tioacetilo	
C18	COCH2CH2SSPy	
C19	guanidinilo	
C20	trimetilglicina	
C21	lauroil	
C22	Trietilenglicoloilo (EG3)	
C23	succinicacetilo	

No.	Nombre	Estructura
C24	difenilfosforilo	
C25	Piperidin-4-ilo	
C26	Tritilpiperidin-4-ilo	
C27	Boc-Piperidin-4-ilo	
C28	Hexin-6-ilo	
C29	5-carboxifluoresceína	

No.	Nombre	Estructura
C30	Benzhidrilo	
C31	p-clorobenzhidrilo	
C32	Piperazinilo (pip)	
C33	trifenilfos	
C34	dimerizado	 Oligo = otro oligómero

Transportadores de péptidos

En algunas realizaciones, el oligómero en cuestión se conjuga con un resto de transportador de péptidos, por ejemplo, un resto de transporte de péptidos que penetra en las células, que es eficaz para mejorar el transporte del oligómero en las células. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el resto transportador de péptidos es un péptido rico en arginina. En realizaciones adicionales, el resto de transporte se une al extremo 5' o 3' del oligómero. Cuando tal péptido se conjuga con cualquiera de los extremos, los extremos opuestos quedan disponibles para la conjugación adicional con un grupo terminal modificado como se describe en el presente documento.

10

En algunas realizaciones de lo anterior, el resto de transporte de péptidos comprende de 6 a 16 subunidades seleccionadas de subunidades X', subunidades Y' y subunidades Z',

dónde

(a) cada subunidad X' representa independientemente lisina, arginina o un análogo de arginina, siendo dicho análogo un α -aminoácido catiónico que comprende una cadena lateral de estructura $R^{33}N=C(NH_2)R^{34}$, donde R^{33} es H o R; R^{34} es

5 R^{35} , NH_2 , NHR o NR^{34} , donde R^{35} es alquilo inferior o alquenilo inferior y puede incluir además oxígeno o nitrógeno; R^{33} y R^{34} pueden juntos formar un anillo; y la cadena lateral está unida a dicho aminoácido a través de R^{33} o R^{34} ;

(b) cada subunidad Y' representa independientemente un aminoácido neutro $-C(O)-(CHR)_n-NH-$, donde n es de 2 a 7 y cada R es independientemente H o metilo; y

(c) cada subunidad Z' representa independientemente un \square -aminoácido que tiene una cadena lateral de aralquilo neutral;

10 donde el péptido comprende una secuencia representada por una de $(X'Y'X')_p$, $(X'Y')_m$ y $(X'Z'Z')_p$, donde p es de 2 a 5 y m es de 2 a 8.

15 En realizaciones seleccionadas, para cada X', el resto de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg). En realizaciones adicionales, cada Y' es $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$, donde n es 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es un 6- subunidad de ácido aminohexanoico, abreviada aquí como Ahx; cuando n es 2 y R es H, Y' es una subunidad de β -alanina.

20 En ciertas realizaciones, los péptidos de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades individuales Y', donde Y' es Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula $(RY'R)_p$ o la fórmula $(RRY')_p$, donde Y' es Ahx. En una realización, Y' es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico, R es arginina y p es 4.

25 En una realización adicional, cada Z' es fenilalanina y m es 3 o 4.

30 En algunas realizaciones, el péptido conjugado se une a un extremo del oligómero a través de un conector Ahx-B, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β -alanina.

35 En realizaciones seleccionadas, para cada X', el resto de la cadena lateral se selecciona independientemente del grupo que consiste en guanidilo ($HN=C(NH_2)NH-$), amidinilo ($HN=C(NH_2)C-$), 2-aminodihidropirimidilo, 2-aminotetrahidropirimidilo, 2-aminopiridinilo y 2-aminopirimidonilo, y se selecciona preferiblemente de guanidilo y amidinilo. En una realización, el resto de cadena lateral es guanidilo, como en la subunidad de aminoácido arginina (Arg).

40 En algunas realizaciones, las subunidades Y' son contiguas, en el sentido de que no intervienen subunidades X' entre las subunidades Y', o se intercalan individualmente entre las subunidades X'. Sin embargo, en algunas realizaciones, la subunidad de enlace puede estar entre las subunidades Y'. En una realización, las subunidades Y' están en un extremo del transportador de péptidos; en otras realizaciones, están flanqueados por subunidades X'. En realizaciones adicionales, cada Y' es $-CO-(CH_2)_n-CHR-NH-$, donde n es 2 a 7 y R es H. Por ejemplo, cuando n es 5 y R es H, Y' es un 6- subunidad de ácido aminohexanoico, abreviada aquí como Ahx. En realizaciones seleccionadas de este grupo, cada X' comprende un resto de cadena lateral de guanidilo, como en una subunidad de arginina. Ejemplos de péptidos de este tipo incluyen aquellos que comprenden dímeros de arginina que alternan con subunidades individuales Y', donde Y' es preferiblemente Ahx. Los ejemplos incluyen péptidos que tienen la fórmula $(RY'R)_4$ o la fórmula $(RRY')_4$, donde Y' es preferiblemente Ahx. En algunas realizaciones, el análogo de ácido nucleico está unido a una subunidad Y' terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal. En otras realizaciones, el conector tiene la estructura AhxB, donde Ahx es una subunidad de ácido 6-aminohexanoico y B es una subunidad de β -alanina.

45 Se ha demostrado que los restos de transporte de péptidos, como se describió anteriormente, mejoran en gran medida la entrada celular de los oligómeros unidos, en relación con la captación del oligómero en ausencia del resto de transporte unido, y en relación con la captación por un resto de transporte unido que carece de las subunidades hidrofóbicas Y'. Tal captación mejorada puede evidenciarse por al menos un aumento de dos veces, o en otras realizaciones un aumento de cuatro veces, en la captación del compuesto en células de mamíferos en relación con la captación del agente por un resto de transporte adjunto que carece de las subunidades hidrofóbicas Y'. En algunas realizaciones, la captación aumenta al menos veinte veces o al menos cuarenta veces, en relación con el compuesto no conjugado.

55 Otro beneficio del resto de transporte de péptidos es su capacidad esperada para estabilizar un dúplex entre un oligómero antisentido y su secuencia de ácido nucleico objetivo. Aunque no se desea ceñirse a la teoría, esta capacidad para estabilizar un dúplex puede resultar de la interacción electrostática entre el resto de transporte cargado positivamente y el ácido nucleico cargado negativamente. En algunas realizaciones, el número de subunidades cargadas en el transportador es inferior a 14, como se indicó anteriormente, o en otras realizaciones entre 8 y 11, ya que un número demasiado alto de subunidades cargadas puede conducir a una reducción en la especificidad de secuencia.

60 La presente descripción también incorpora conjugados de restos de transporte de péptidos y análogos de ácidos nucleicos. Como se indicó anteriormente, los restos de transporte de péptidos son generalmente efectivos para mejorar la penetración celular de los análogos de ácidos nucleicos. Los solicitantes también han descubierto que incluir una subunidad de aminoácido de glicina (G) o prolina (P) entre el análogo de ácido nucleico y el resto del resto de transporte del péptido (por ejemplo, en el extremo carboxi o amino del péptido transportador) reduce la toxicidad del conjugado,

mientras que la eficacia sigue siendo la misma o mejora en relación con los conjugados con diferentes enlaces entre el resto de transporte de péptidos y el análogo de ácido nucleico. Por lo tanto, los conjugados descritos en la presente tienen una mejor ventana terapéutica y son candidatos a fármacos más prometedores que otros conjugados de péptido-oligómero.

5

Además de la toxicidad reducida, se cree que la presencia de una subunidad de aminoácido de glicina o prolina entre el análogo de ácido nucleico y el péptido portador proporciona ventajas adicionales. Por ejemplo, la glicina es económica y se acopla fácilmente al análogo de ácido nucleico (o enlazador opcional) sin ninguna posibilidad de racemización. De manera similar, la prolina se acopla fácilmente sin racemización y también proporciona péptidos transportadores que no son formadores de hélices. La hidrofobicidad de la prolina también puede conferir ciertas ventajas con respecto a la interacción del péptido transportador con la bicapa lipídica de las células, y los péptidos transportadores que comprenden múltiples prolinas (por ejemplo, en ciertas realizaciones) pueden resistir la formación de G-tetraplex. Finalmente, en ciertas realizaciones, cuando el resto de prolina es adyacente a una subunidad de aminoácido de arginina, el resto de prolina confiere estabilidad metabólica a los conjugados ya que el enlace amida de argina-prolina no es escindible por las endopeptidasas comunes.

En algunas realizaciones, la conjugación de péptidos con oligonucleótidos antisentido es como se describe en la publicación PCT WO2012/1150960. En una realización particular, por ejemplo, un oligonucleótido conjugado con péptido utiliza glicina como conector entre el CPP y el oligonucleótido antisentido. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido para usar en la invención se pueden acoplar a un péptido rico en arginina, como (Arg)6Gly (6 arginina y 1 glicina unidas a un oligonucleótido). Como ejemplo, este péptido se puede conjugar con un PMO y se conoce como "R6-G-PMO".

A continuación, en la Tabla 5, se proporcionan otros transportadores de péptidos de penetración celular ricos en arginina ejemplares que comprenden varios enlazadores (C, G, P, Ahx, B). Como se describe en la Tabla 2 anterior, un transportador de péptidos de penetración celular preferido es SEQ ID NO: 45 conjugado con un PMO en el extremo 3' a través de un enlazador de glicina (R6G). El enlace de R6G al extremo 5' también es una realización preferida.

Tabla 5. Transportadores de péptidos ricos en arginina que penetran en las células

NOMBRE (DENOMINACIÓN)	SECUENCIA	SEQ ID NO. ^A
rTAT	RRRQRRKKR	39
Tat	RKKRRQRRRR	40
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	41
R ₅ F ₂ R4	RRRRRFFRRRR	42
R ₄	RRRRR	43
R ₅	RRRRR	44
R ₆	RRRRR	45
R ₇	RRRRRRR	46
R ₈	RRRRRRR	47
R ₉	RRRRRRRRR	48
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXRX	49
(RAhxAxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	50
(RAhxAxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	51
(RAhxAxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRAhxRRBR	52
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFFC	53
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRGRFFC	54

^ALas secuencias asignadas a SEQ ID NO incluyen la porción de enlace (por ejemplo, C, G, P, Ahx, B, AhxB donde Ahx y B se refieren al ácido 6-aminohexanoico y beta-alanina, respectivamente).

30

Métodos de uso in vitro (no forma parte de la presente invención)

En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos para usar los oligonucleótidos antisentido dirigidos a LMNA y/o HGPS descritos en el presente documento para tratar una célula o tejido in vitro para reducir la expresión de una o más isoformas de ARNm y/o proteínas mutantes de manera beneficiosa. Las células o tejidos que pueden ser

modulados por los oligonucleótidos antisentido son preferiblemente células de mamíferos, o más preferiblemente células humanas. Dichas células pueden estar en un estado saludable o en un estado enfermo, como las células que expresan progerina. En ciertos aspectos, la célula es una célula que expresa progerina que da como resultado una laminopatía progeroide.

5

En este documento se describen generalmente métodos para reducir la expresión de ARNm de LMNA empalmado anormalmente in vitro que comprende poner en contacto una célula con uno o más oligonucleótidos antisentido descritos en este documento, o una composición que los contiene, reduciendo así la expresión de progerina. Estos métodos y otros relacionados se pueden usar para reducir la expresión de cualquiera o más de las isoformas mutantes de ARNm de LMNA descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

10 Los métodos in vitro pueden emplear composiciones que comprenden oligonucleótidos en combinación con vehículos farmacéuticamente aceptables. La frase "farmacéuticamente aceptable" se emplea en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuados para su uso en contacto con células y/o tejidos sin una toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

15 La frase "vehículo farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento significa un material, una composición o un vehículo farmacéuticamente aceptable, como un relleno líquido o sólido, un diluyente, un excipiente, un auxiliar de fabricación (por ejemplo, lubricante, talco, estearato de magnesio, calcio o zinc, o ácido estérico), o material de encapsulación de disolvente. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para la célula o tejido con el que entra en contacto.

20 25 Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, entre otros: (1) azúcares, como lactosa, glucosa y sacarosa; (2) almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; (3) celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; (4) polvo de tragacanto; (5) malta; (6) gelatina; (7) talco; (8) excipientes, como manteca de cacao y ceras para supositorios; (9) aceites, como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; (10) glicoles, como propilenglicol; (11) polioles, como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; (12) ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; (13) agar; (14) agentes amortiguadores, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; (15) ácido algínico; (16) agua libre de pirógenos; (17) solución salina isotónica; (18) solución de Ringer; (19) alcohol etílico; (20) soluciones tamponadas de pH; (21) poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y (22) otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

30 35 40 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad de comprensión, será evidente para un experto en la materia a la luz de las enseñanzas de esta invención que ciertos cambios y modificaciones pueden hacerse al mismo dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los siguientes ejemplos se proporcionan únicamente a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que podrían cambiarse o modificarse para producir resultados esencialmente similares.

Tabla de listado de secuencias

NOMBRE	SECUENCIA	SEQ ID NO:
LMNA exón 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTGGGGACCCGCTGAGTA CAACCTGCGCTCGCGACCGTGTGCGGGACCTGCG GGCAGCTGCCACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGA GCCCAGGTGGGCGGACCCATCTCCTCTGGCTCTCTGC CTCCAGTGTACGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGG GGGGCAGTGGGGTGGCAGCTCGGGGACAATCTGGTC ACCCGCTCCTACCTCCTGGCAACTCCAGCCCCGAAC CCAG	1
HGPS exón 11	GGCTCCCACTGCAGCAGCTGGGGACCCGCTGAGTA CAACCTGCGCTCGCGACCGTGTGCGGGACCTGCG GGCAGCTGCCACAAGGCATCTGCCAGCGGCTCAGGA GCCCAGGTGGGTTGGACCCATCTCCTCTGGCTCTCTGC CTCCAGTGTACGGTCACTCGCAGCTACCGCAGTGTGG GGGGCAGTGGGGTGGCAGCTCGGGGACAATCTGGTC ACCCGCTCCTACCTCCTGGCAACTCCAGCCCCGAAC CCAG	2

exo11.25.138	CTGAGCCGCTGGCAGATGCCCTGTC	4
exo11.25.166	GAGGAGATGGGTCCACCCACCTGGG	11
rTAT	RRRQRRKKR	39
Tat	RKKRRQRRRR	40
R ₉ F ₂	RRRRRRRRRFF	41
R ₅ F ₂ R ₄	RRRRRFFRRRR	42
R ₄	RRRRR	43
R ₅	RRRRR	44
R ₆	RRRRR	45
R ₇	RRRRRRR	46
R ₈	RRRRRRR	47
R ₉	RRRRRRRRR	48
(RX) ₈	RXRXRXRXRXRXRXRX	49
(RAxR) ₄ ; (P007)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	50
(RAhxR) ₅ ; (CP04057)	RAhxRRAhxRRAhxRRAhxRRAhxR	51
(RAhxRRBR) ₂ ; (CP06062)	RAhxRRBRRRAhxRRBR	52
(RAR) ₄ F ₂	RARRARRARRARFFC	53
(RGR) ₄ F ₂	RGRRGRRGRRGRFFC	54

Ejemplos

Ejemplo 1

- 5 Tratamiento de células hgps con oligonucleótidos antisentido dirigidos a LMNA

Se usaron dos líneas primarias de fibroblastos, fibroblastos HGPS (HGADFN167) y fibroblastos de control (HGDFN168). Las células HGPS y de control se sembraron en una placa de 24 pocillos a una densidad de aproximadamente 10.000 células/pocillo. Los oligonucleótidos de morfolino dirigidos a los exones 11 y/o 10 de pre-ARNm de Lamin-A se introdujeron individualmente en células HGPS cultivadas ya sea por captación libre o por nucleofección (Amaxa, por ejemplo). Para la captación libre, las células se cultivaron durante 1-2 semanas en un medio que contenía 25 mM o 50 mM o 80 μ M de oligonucleótidos de PMO. A continuación, esas células se cribaron mediante inmunofluorescencia con anticuerpos anti-progerina o anti-lámina A/C. Las intensidades de fluorescencia de la tinción de progerina se cuantificaron utilizando un microscopio de fluorescencia Zeiss y un programa SPOT. Los experimentos se realizaron por triplicado y los PMO que mostraron efectos en la regulación a la baja de la progerina se seleccionaron para un análisis posterior. El análisis incluyó RT-PCR cuantitativa con cebador específico de progerina y análisis de transferencia Western con anticuerpos anti-progerina.

Ejemplo 2

20 Tinción de inmunofluorescencia de células HGPS después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a LMNA

25 *Tinción de inmunofluorescencia:* Para la inmunofluorescencia, las células se sembraron en portaobjetos de cámara de 4 pocillos. Después de la fijación en paraformaldehído al 4 %/PBS a temperatura ambiente durante 15 min, las células se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,5 %/PBS a temperatura ambiente durante 5 min, seguido de una incubación durante la noche en la solución de bloqueo a 4 °C (solución de bloqueo: 4% BSA/TBS). Las células se tiñeron con antilámina A/C monoclonal de ratón (MAB3211, Chemicon) y antiprogerina polyclonal de conejo (anticuerpo peptídico personalizado, 30 Yenzm) durante 3 horas a temperatura ambiente al día siguiente. Los anticuerpos primarios se detectaron con anticuerpos secundarios marcados con Alexa Fluor (Invitrogen). Los portaobjetos montados con medio de montaje Vectashield que contenía DAPI se observaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss. Los tiempos de exposición y los ajustes de adquisición se establecieron al comienzo de cada conjunto de experimentos y se mantuvieron constantes para todos los tratamientos. Los resultados de los experimentos se exponen en la Figura 2. Varios de los oligonucleótidos regularon

significativamente a la baja la progerina.

Ejemplo 3

- 5 SDS-PAGE y análisis de western blotting de células HGPS después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a LMNA

10 *Análisis SDS-PAGE y Western Blot:* Las células tratadas se recogieron, se enjuagaron dos veces en PBS y luego se lisaron en tampón de carga Laemmli SDS-PAGE. Las muestras se calentaron durante 15 minutos a 95°C y luego se 15 cargaron en geles SDS-PAGE al 10%. En cuanto al análisis de transferencia Western, las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche al 5%/TBST a 4 °C durante la noche y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA al 4 %/TBST a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Después de los lavados con TBST, las membranas se incubaron en anticuerpos secundarios diluidos a 1:5000 en leche al 1%/TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia se detectó con un kit de detección de transferencia 20 Western ECL (Pierce). Los anticuerpos primarios utilizados incluyen antilámina A/C monoclonal de ratón (MAB3211, Chemicon), antiprogerina policlonal de conejo (anticuerpo peptídico personalizado, Yenzm) y antiactina policlonal de conejo (Pan-actin, Cell Signaling). Los resultados de los experimentos se exponen en la Figura 3. El oligonucleótido correspondiente a 699 (SEQ ID NO:4) mostró una regulación negativa significativa de la progerina en el experimento, a pesar de que se eliminó y no se superpuso con el sitio de empalme críptico del exón 11 de LMNA.

Ejemplo 4

25 Análisis cuantitativo por RT-PCR de células HGPS después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a LMNA

30 *RT-PCR cuantitativa:* Se realizaron experimentos cuantitativos de RT-PCR (qRT-PCR) para medir los niveles de expresión de progerina, lámina A y β-actina en 164 fibroblastos (p13, HGPS clásico) después del tratamiento con el oligonucleótido 35 699 (SEQ ID NO: 4) y 706 (SEQ ID NO: 11). Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en un sistema de PCR rápido en tiempo real 7900HT de Applied Biosystems utilizando SYBR Green mix (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclos de 2 min a 50°C; 1 ciclo de 15 min a 95°C; y 40 ciclos de 15 s a 95°C, 1 min a 57°C y 45 s a 72°C. La secuencia del cebador directo de β-actina es TCTTGCAGCCACATTCCCG y el cebador inverso es GGCTTGCGGGTGTAAAGC. La secuencia del cebador directo para amplificar progerina/lámina A es GCAACAAGTCCAATGAGGACCA. Los cebadores inversos específicos de progerina y lámina A se diseñaron de acuerdo con la estrategia del sistema de mutación refractario a la amplificación, mediante la introducción de una mutación en la penúltima base para aumentar la especificidad. La secuencia del cebador específico de progerina es CATGATGCTGCAGTTCTGGGGCTCTGGAC, y la de la lámina A es CAT-40 GATGCTGCAGTTCTGGGGCTCTGGAT. Los resultados de los experimentos se exponen en la Figura 4.

Ejemplo 5

45 SDS-PAGE y análisis de western blotting de células HGPS después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido dirigidos a LMNA

50 *Análisis SDS-PAGE y Western Blot:* Las células tratadas se recogieron, se enjuagaron dos veces en PBS y luego se lisaron en tampón de carga Laemmli SDS-PAGE. Las muestras se calentaron durante 15 minutos a 95°C y luego se 55 cargaron en geles SDS-PAGE al 10%. En cuanto al análisis de transferencia Western, las proteínas se transfirieron a las membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con leche al 5%/TBST a 4 °C durante la noche y se incubaron con anticuerpos primarios diluidos en BSA al 4 %/TBST a temperatura ambiente durante 1-3 horas. Después de los lavados con TBST, las membranas se incubaron en anticuerpos secundarios diluidos a 1:5000 en leche al 1%/TBST durante 1 hora a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia se detectó con un kit de detección de transferencia Western ECL (Pierce). Los anticuerpos primarios utilizados incluyen antilámina A/C monoclonal de ratón (MAB3211, Chemicon), antiprogerina policlonal de conejo (anticuerpo peptídico personalizado, Yenzm) y antiactina conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Sigma). Los resultados de los experimentos se exponen en la Figura 5. Oligonucleótido 699 (SEQ ID NO: 4) dio lugar a una regulación negativa de la progerina y una regulación positiva de la lámina A, a pesar de que se eliminó y no se superpuso con el sitio de empalme críptico del exón 11 de LMNA.

Referencias

- 60 Cao, K., C. D. Blair, et al. (2011). "La disfunción de la progerina y los telómeros colabora para desencadenar la senescencia celular en los fibroblastos humanos normales". *J Clin Invest.*
- Egholm, M., O. Buchardt, et al. (1993). "El PNA se hibrida con oligonucleótidos complementarios que obedecen las reglas de enlace de hidrógeno de Watson-Crick". *Nature* 365 (6446): 566-8.
- 65 Kinali, M., V. Arechavala-Gomeza, et al. (2009). "Restauración local de la expresión de distrofina con el oligómero de morfolino AVI-4658 en la distrofia muscular de Duchenne: un estudio simple ciego, controlado con placebo, de aumento

- de dosis, de prueba de concepto". Lancet Neurol 8(10): 918-28.
- Osorio, FG, CL Navarro, et al. (2011). "Terapia dirigida por empalme en un nuevo modelo de ratón de humanos acelerado envejecimiento." Sci Transl Med 3(106): 395106ra107.
- 5 Scaffidi, P. y T. Misteli (2005). "Reversión del fenotipo celular en la enfermedad de envejecimiento prematuro síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford". Nat Med 11(4): 440-5.
- Swasti, S., T. Suwanmanee, et al. (2009). "La reparación de ARN restaura la expresión de hemoglobina en ratones talasémicos IVS2-654". Proc Natl Acad Sci U S A 106(4): 1205-10.
- 10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un oligonucleótido antisentido para usar en la modulación del empalme aberrante de un pre-ARNm de LMNA humano, donde el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido de fosforodiamidato morfolino; donde el oligonucleótido antisentido tiene 25 nucleobases; y donde el oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de direccionamiento que comprende cualquiera de las SEQ ID NO: 4 u 11.
- 10 2. El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1, donde la secuencia de direccionamiento comprende SEQ ID NO: 4.
3. El oligonucleótido antisentido de conformidad con la reivindicación 1, donde la secuencia de direccionamiento comprende SEQ ID NO: 11.

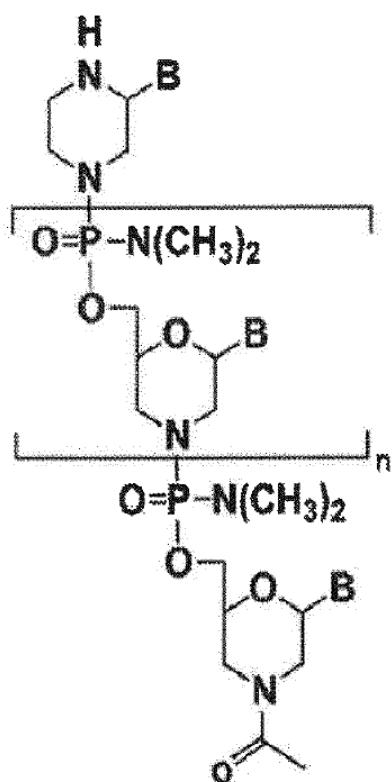


Fig. 1A

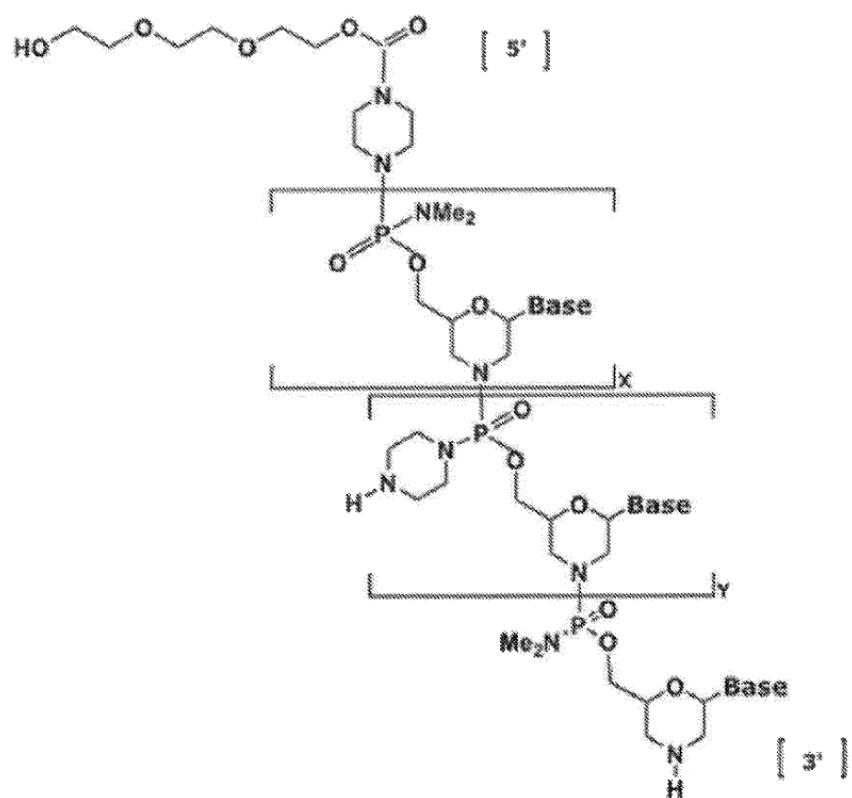


Fig. 1B

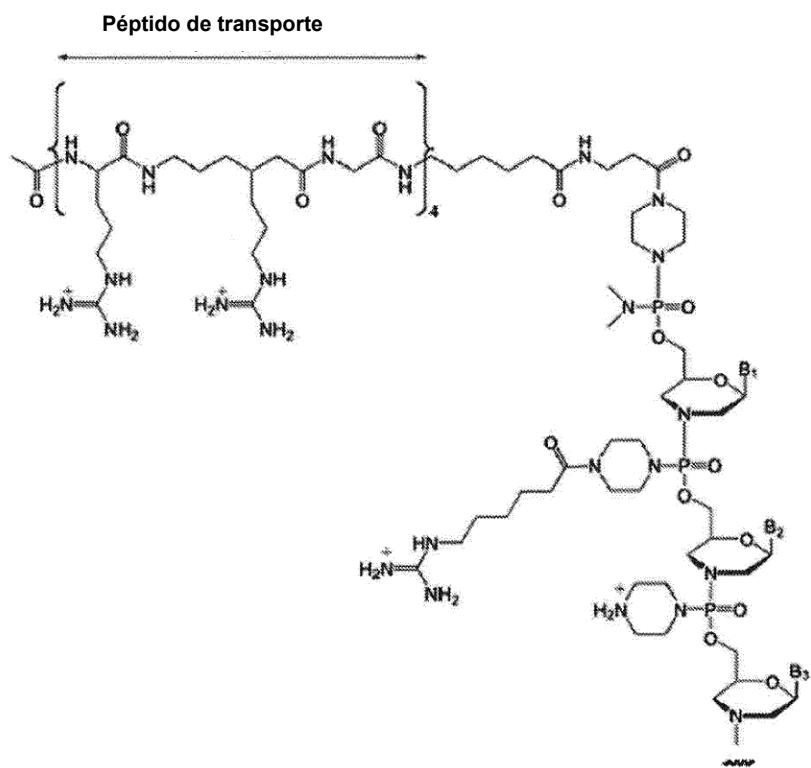


Fig. 1C

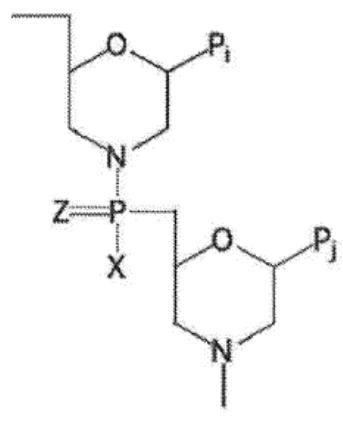


Fig. 1D

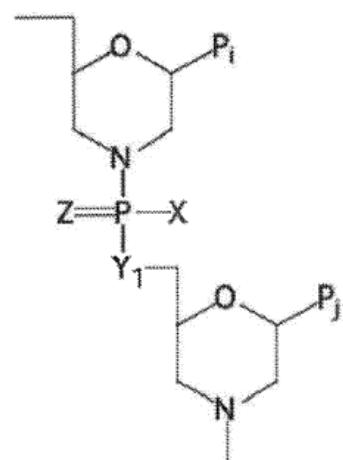


Fig. 1E

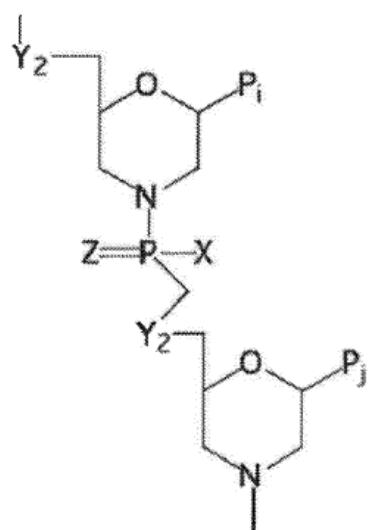


Fig. 1F

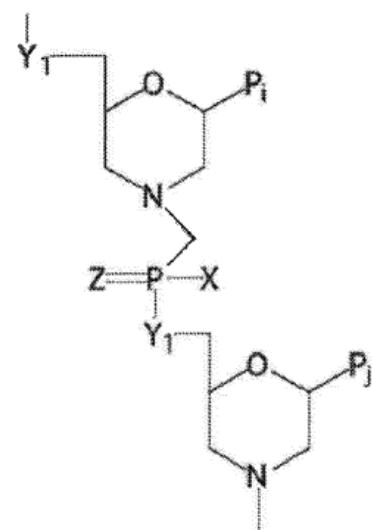


Fig. 1G

SSO #/SEQ ID NO:	Cribado inicial IF (6 días a 50µM)	Lámina A/C (%)		Progerina (%)
		100,000	100,000	
Ninguno				
711/16		*61.786		*59.663
709/14		108.805		*64.186
705/10		*108.207		*67.607
699/4		*87.305		*75.803
706/11		*115.919		*79.194
708/13		85.908		*82.588
700/5		91.136		*82.817
698/3		*77.241		89.421
707/12		*90.455		92.44
702/7		*111.877		95.114
703/8		*116.475		104.998
701/6		96.477		106.397
704/9		*136.971		111.343
710/15		99.673		*123.422

* Cambio significativo (p<0.05)

Fig. 2

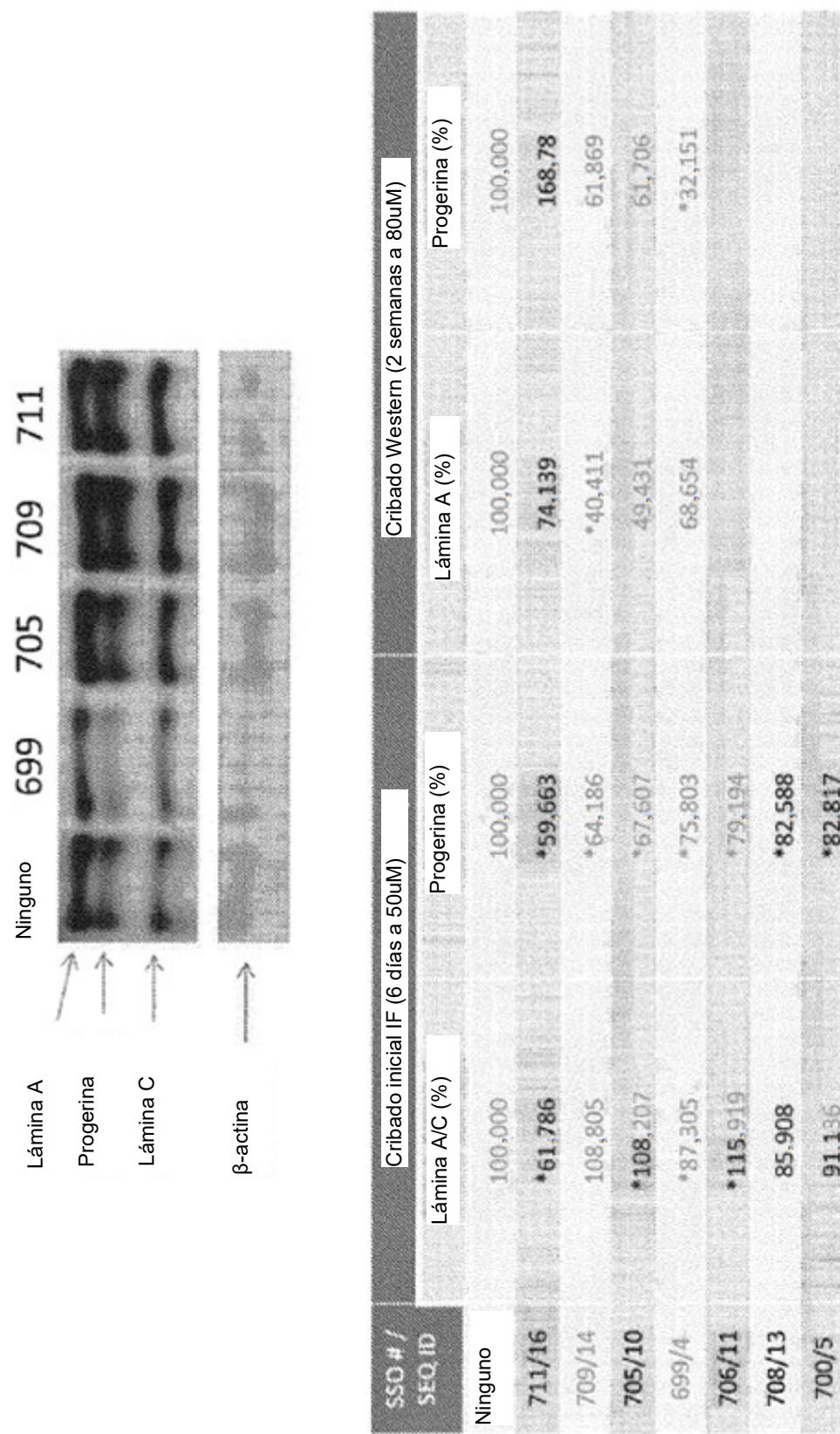


Fig. 3

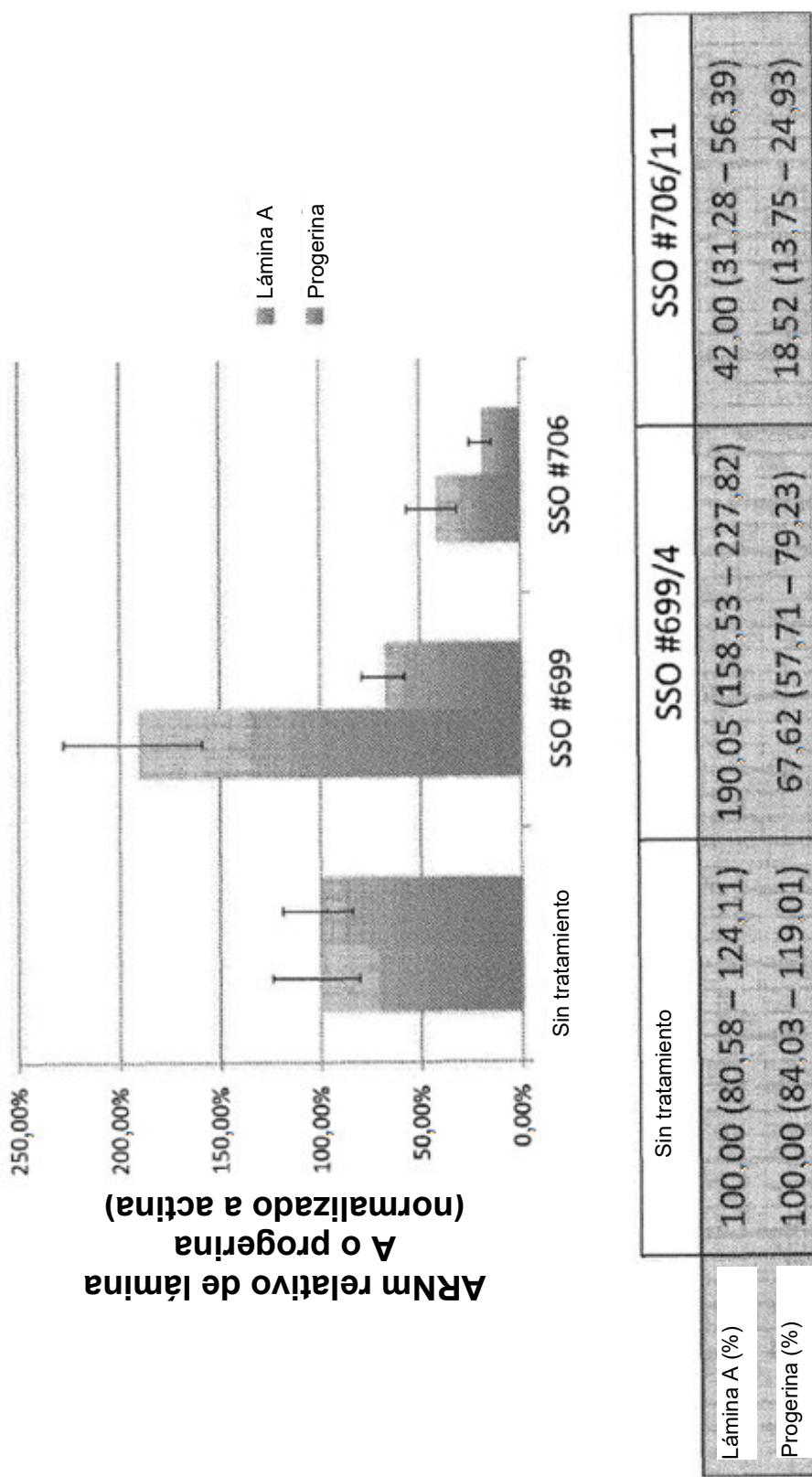


Fig. 4

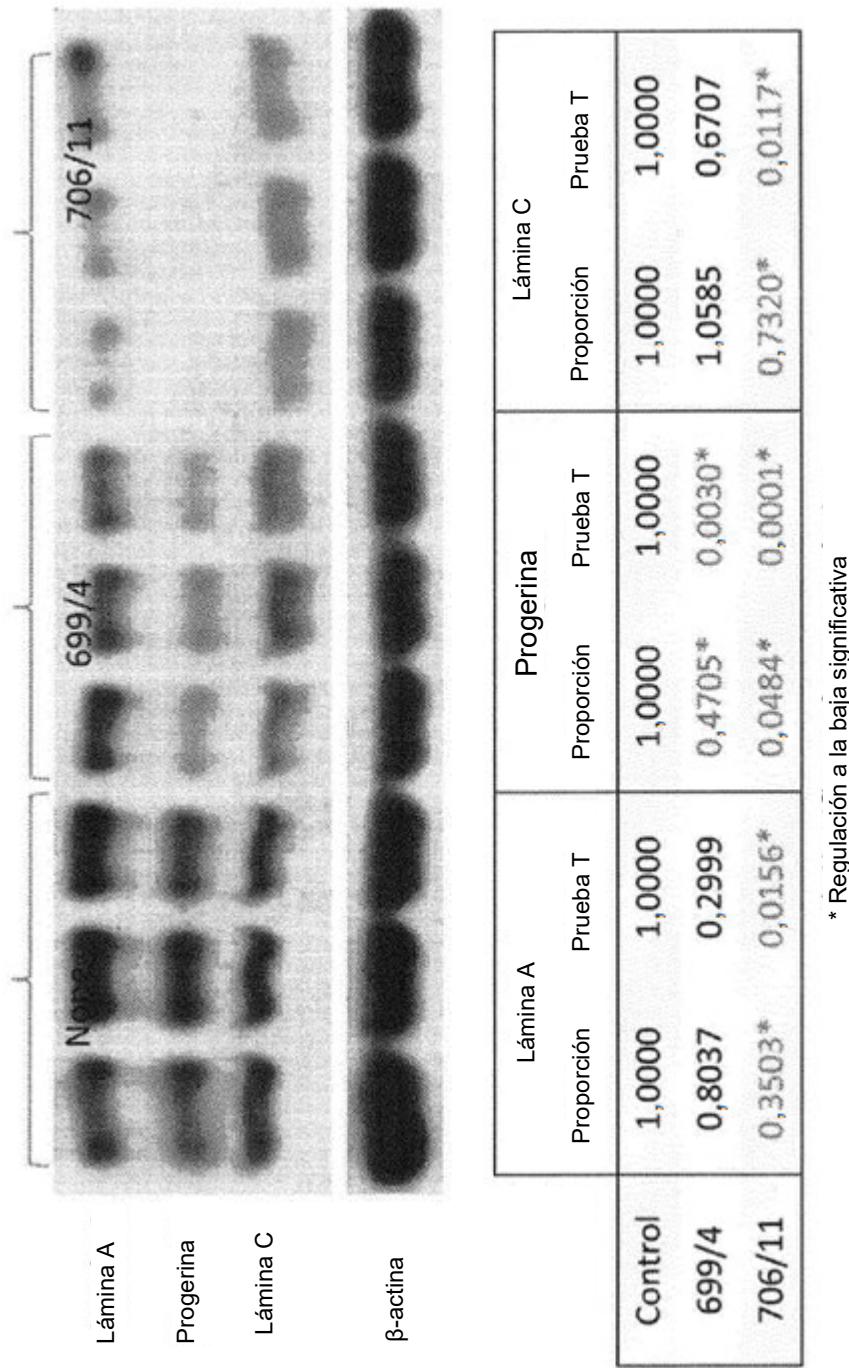


Fig. 5