

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 990 026**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.11.2021 PCT/US2021/059896**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.05.2022 WO22109139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2021 E 21895589 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2024 EP 4136092**

54 Título: **Compuestos y métodos para modular la expresión del angiotensinógeno**

30 Prioridad:

18.11.2020 US 202063115499 P
11.08.2021 US 202163232109 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.11.2024

73 Titular/es:

IONIS PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
2855 Gazelle Court
Carlsbad, CA 92010, US

72 Inventor/es:

MULLICK, ADAM y
FREIER, SUSAN, M.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 990 026 T3

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

DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para modular la expresión del angiotensinógeno

5 LISTA DE SECUENCIAS

[0001] La presente solicitud se presenta junto con un Listado de Secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado BIOL0393WOSEQ_ST25.txt, creado el 3 de noviembre de 2021, que tiene un tamaño de 32 KB.

10 Campo

[0002] En el presente documento se describen compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas para reducir la cantidad o la actividad del ARN del angiotensinógeno en una célula o sujeto y, en ciertos casos, para reducir la cantidad de angiotensinógeno (AGT) en una célula o sujeto. Dichos compuestos y composiciones farmacéuticas son útiles para mejorar al menos un síntoma o característica distintiva de una enfermedad o trastorno relacionado con la vía del RAAS. Tales enfermedades y trastornos incluyen hipertensión, emergencia hipertensiva (es decir, hipertensión maligna), hipertensión resistente, enfermedad renal (por ejemplo, enfermedad renal crónica, enfermedad renal poliquística), preeclampsia, síndrome de Marfan, accidente cerebrovascular, enfermedad cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, cardiopatía valvular), aneurismas de los vasos sanguíneos, aneurisma abdominal, arteriopatía periférica, daño orgánico, hipertensión arterial pulmonar, obesidad, síndrome metabólico, NASH, NAFLD y otras enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionados con el RAAS o sus síntomas.

25 Fondo

[0003] El angiotensinógeno (AGT), también conocido como SERPINA8 o ANHU, es un miembro de la familia de las serpinas y es un componente del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). Se produce principalmente en el hígado y se libera a la circulación, donde la renina la convierte en angiotensina I. Posteriormente, la enzima convertidora de angiotensina (ACE) transforma la angiotensina I en angiotensina II. La angiotensina II es una hormona peptídica que provoca una vasoconstricción que, a su vez, puede aumentar la tensión arterial. La angiotensina II también estimula la secreción de la hormona aldosterona de la corteza suprarrenal. La aldosterona hace que los riñones aumenten la reabsorción de sodio y agua, lo que provoca un aumento del volumen de líquido en el organismo que, a su vez, puede aumentar la tensión arterial. La sobreestimulación o actividad de la vía del RAAS puede provocar hipertensión arterial. La presión arterial alta crónica se conoce como hipertensión. La presión arterial elevada en un sujeto hipertenso exige que el corazón trabaje más para hacer circular la sangre por los vasos sanguíneos.

[0004] La hipertensión sigue siendo una de las principales causas de muerte y discapacidad por enfermedad cardiovascular y accidente cerebrovascular en todo el mundo. A pesar de las numerosas investigaciones realizadas y de la existencia de múltiples intervenciones terapéuticas eficaces, la hipertensión sigue siendo un importante problema de salud pública en Estados Unidos (Sigmund et al., Hypertension 2020, 75.): 902-917). Las terapias actualmente aprobadas para el tratamiento de la hipertensión presentan limitaciones, ya que un subconjunto significativo de todos los pacientes hipertensos no logra un control adecuado de la presión arterial. Por ejemplo, fármacos como los inhibidores ACE y los bloqueantes de los receptores de angiotensina (ARB) que se dirigen a partes de la vía del sistema renina-angiotensina (RAS) tienen una capacidad limitada para inhibir la vía del RAAS (Nobakht et al., Nat Rev Nephrol, 2011, 7:356-359). Además, ciertos fármacos antihipertensivos como los inhibidores de la ACE están contraindicados en pacientes hipertensos con enfermedad renal debido a su potencial para comprometer la función renal de los pacientes.

[0005] En consecuencia, existe la necesidad de encontrar tratamientos alternativos para inhibir la vía RAAS y tratar la hipertensión. Por lo tanto, un objetivo del presente documento es proporcionar compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento de dichas enfermedades.

Resumen de la Invención

[0006] La invención proporciona un compuesto oligomérico que comprende un oligonucleótido modificado según la siguiente notación química: ^mC_{es}G_{eo} ^mC_{ko}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds} ^mC_{ds} ^mC_{ds}G_{kc}G_{ks}G_e (SEQ ID N.º: 12), en la que:

- A = una nucleobase de adenina,
- ^mC = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- e = una fracción de azúcar 2'-β-D-MOE,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- s = un enlace internucleósido fosforotioato, y
- o = un enlace fosfodiéster internucleósido.

[0007] La invención también proporciona una población del compuesto oligomérico, en la que todos los enlaces internucleósidos de fosforotioato del compuesto oligomérico son estereorándomicos.

5 **[0008]** La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico, o la población y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 **[0009]** En el presente documento se describen compuestos, métodos y composiciones farmacéuticas para reducir la cantidad o la actividad del ARN de AGT y, en ciertas realizaciones, reducir la expresión de la proteína AGT en una célula o sujeto.

15 **[0010]** En ciertas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad cardiovascular. En ciertas realizaciones, el sujeto padece hipertensión. En ciertas realizaciones, el sujeto tiene hipertensión resistente. En ciertas realizaciones, el sujeto padece el síndrome de Marfan. En ciertas realizaciones, el sujeto padece una enfermedad renal. Los compuestos útiles para reducir la cantidad o la actividad del ARN AGT pueden ser compuestos oligoméricos. Los compuestos útiles para disminuir la expresión de la proteína AGT pueden ser compuestos oligoméricos. Los compuestos útiles para disminuir la expresión de la proteína AGT pueden ser oligonucleótidos modificados.

20 **[0011]** También se proporcionan composiciones farmacéuticas para su uso en métodos para mejorar al menos un síntoma o sello distintivo de una enfermedad o indicación relacionada con la vía RAAS, como se define en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, la enfermedad es hipertensión. En ciertas realizaciones, la enfermedad es hipertensión resistente. En ciertas realizaciones, la enfermedad es el síndrome de Marfan. En ciertas realizaciones, la indicación es la insuficiencia cardíaca. En ciertas realizaciones, el síntoma o sello distintivo incluye hipertensión, emergencia hipertensiva (es decir, hipertensión maligna), preeclampsia, accidente cerebrovascular, enfermedad cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, insuficiencia cardíaca congestiva, enfermedad cardíaca valvular), aneurismas de los vasos sanguíneos, aneurisma abdominal, daño orgánico, hipertensión arterial pulmonar, obesidad y otras enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionados con la vía del RAAS o síntomas de los mismos.

30 **Descripción Detallada de la Invención**

[0012] Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la descripción detallada siguiente son meramente ejemplares y explicativas. Aquí, el uso del singular incluye el plural a menos que se indique específicamente lo contrario. En el presente documento, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "que incluye", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no es limitativo. Asimismo, términos como "elemento" o "componente" engloban tanto elementos y componentes que comprenden una unidad como elementos y componentes que comprenden más de una subunidad, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Definiciones

40 **[0013]** A menos que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en relación con, y los procedimientos y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica aquí descritos son los bien conocidos y comúnmente utilizados en la técnica.

45 **[0014]** A menos que se indique lo contrario, los siguientes términos tienen el significado que se indica a continuación:

DEFINICIONES

50 **[0015]** Tal como se utiliza en el presente documento, "2'-desoxinucleósido" significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar 2'-H(H) desoxifuranosil. En ciertas realizaciones, un 2'-desoxinucleósido es un 2'-p-D-desoxinucleósido y comprende una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, que tiene la configuración β-D que se encuentra en los ácidos desoxirribonucleicos (ADN) naturales. Un 2'-desoxinucleósido puede comprender una nucleobase modificada o una nucleobase de ARN (uracilo).

55 **[0016]** Tal como se utiliza en el presente documento, "2'-MOE" significa un grupo 2'-OCH₂CH₂OCH₃ en lugar del grupo 2'-OH de una fracción de azúcar furanosil. Una "fracción de azúcar 2'-MOE" es una fracción de azúcar con un grupo 2'-OCH₂CH₂OCH₃ en lugar del grupo 2'-OH de una fracción de azúcar furanosilo. A menos que se indique lo contrario, una fracción de azúcar 2'-MOE está en la configuración β-D-ribosil. "MOE" significa O-metoxietilo.

60 **[0017]** Tal como se utiliza en el presente documento, "nucleósido 2'-MOE" significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar 2'-MOE.

65 **[0018]** Tal como se utiliza en el presente documento, "2'-OMe" significa un grupo 2'-OCH₃ en lugar del grupo 2'-OH de una fracción de azúcar furanosil. Tal como se utiliza en el presente documento, por "fracción de azúcar 2'-O-metil" o "fracción de azúcar 2'-OMe" se entiende una fracción de azúcar con un grupo 2'-OCH₃ en lugar del grupo 2'-OH de una fracción de azúcar furanosil. A menos que se indique lo contrario, una fracción de azúcar 2'-OMe está en la configuración β-D-ribosil.

[0019] Como se usa aquí, "nucleósido 2'-OMe" significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar 2'-OMe.

[0020] Tal como se utiliza aquí, "nucleósido sustituido en 2'" significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar sustituida en 2'. Como se utiliza aquí, "sustituida en 2'" en referencia a una fracción de azúcar significa una fracción de azúcar que comprende al menos un grupo sustituyente en 2' distinto de H u OH.

[0021] Tal como se utiliza aquí, "5-metil citosina" significa una citosina modificada con un grupo metilo unido a la posición 5. Una 5-metil citosina es una nucleobase modificada.

[0022] Tal como se utiliza aquí, "Aproximadamente" significa dentro de $\pm 10\%$ de un valor. Por ejemplo, si se afirma "los compuestos afectaron a cerca del 70% de inhibición de AGT", se da a entender que los niveles de AGT se inhiben dentro de un intervalo del 63% y el 77%.

[0023] Tal como se utiliza aquí, "administrar" significa proporcionar un agente farmacéutico a un sujeto.

[0024] En el presente documento, "angiotensinógeno" y "AGT" se utilizan indistintamente. El angiotensinógeno también se conoce como SERPINA8 y ANHU.

[0025] Tal como se utiliza en el presente documento, "fármaco antihipertensivo" se refiere a un fármaco capaz de reducir la presión arterial. Algunos ejemplos de estos fármacos son, entre otros, los inhibidores del RAAS, los diuréticos, los bloqueantes de los canales de calcio, los antagonistas de los receptores adrenérgicos, los agonistas adrenérgicos y los vasodilatadores. En un ejemplo, el fármaco antihipertensivo captopril puede utilizarse en combinación con el compuesto de AGT descrito en el presente documento para su uso en un método para tratar a un animal que tenga o corra el riesgo de tener una enfermedad, trastorno y/o afección relacionados con la vía del RAAS.

[0026] Tal como se utiliza en el presente documento, por "actividad antisentido" se entiende cualquier cambio detectable y/o medible atribuible a la hibridación de un compuesto antisentido con su ácido nucleico diana. En ciertas realizaciones, la actividad antisentido es una disminución en la cantidad o expresión de un ácido nucleico diana o proteína codificada por dicho ácido nucleico diana en comparación con los niveles de ácido nucleico diana o niveles de proteína diana en ausencia del compuesto antisentido.

[0027] Tal como se utiliza aquí, "compuesto antisentido" significa un compuesto oligomérico o dúplex oligomérico capaz de lograr al menos una actividad antisentido.

[0028] Tal como se utiliza en el presente documento, "mejorar" en referencia a un tratamiento significa la mejora de al menos un síntoma en relación con el mismo síntoma en ausencia del tratamiento. En ciertas realizaciones, la mejoría es la reducción de la gravedad o frecuencia de un síntoma o el retraso en la aparición o ralentización de la progresión de la gravedad o frecuencia de un síntoma. La progresión o gravedad de los indicadores puede determinarse mediante medidas subjetivas u objetivas, conocidas por los expertos en la materia.

[0029] Tal y como se utiliza aquí, "presión sanguínea" se refiere a la presión de la sangre en el sistema circulatorio contra las paredes del vaso sanguíneo. La presión arterial se debe principalmente a los latidos del corazón de un animal. Durante cada latido, la tensión arterial varía entre una tensión arterial máxima (sistólica) (SBP) y una tensión arterial mínima (diastólica) (DBP). La presión arterial media (MAP) es la presión arterial media durante un ciclo de latidos. La tensión arterial puede medirse con un tensiómetro (es decir, un esfigmomanómetro). La tensión arterial normal en reposo es inferior a 120 mmHg sistólica e inferior a 80 mmHg diastólica y se expresa comúnmente como la tensión sistólica (lectura superior) / tensión diastólica (lectura inferior) mmHg.

[0030] Como se usa aquí, "nucleósido bicíclico" o "BNA" significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar bicíclica.

En el presente documento, por "azúcar bicíclico" o "fracción de azúcar bicíclico" se entiende una fracción de azúcar modificado que comprende dos anillos, en la que el segundo anillo se forma mediante un puente que conecta dos de los átomos del primer anillo, formando así una estructura bicíclica. En ciertas realizaciones, el primer anillo de la fracción de azúcar bicíclico es una fracción de furanosilo. En ciertas realizaciones, la fracción de azúcar furanosil es una fracción ribosil. Una fracción de azúcar bicíclico de la divulgación puede no comprender una fracción de furanosilo.

[0032] Tal como se utiliza en el presente documento, "cEt" significa un puente de 4' a 2' en lugar del grupo 2'OH de una fracción de azúcar ribosílico, en el que el puente tiene la fórmula 4'-CH(CH₃)-O-2', y en el que el grupo metilo del puente está en la configuración S. Una "fracción de azúcar cEt" es una fracción de azúcar bicíclica con un puente de 4' a 2' en lugar del grupo 2'OH de una fracción de azúcar ribosilo, en la que el puente tiene la fórmula 4'-CH(CH₃)-O-2', y en la que el grupo metilo del puente está en la configuración S. "cEt" significa etilo restringido.

[0033] Tal como se utiliza aquí, "nucleósido cEt" significa un nucleósido que comprende una fracción de azúcar cEt.

[0034] Tal como se utiliza en el presente documento, "fracción escindible" significa un enlace o grupo de átomos que se escinde en condiciones fisiológicas, por ejemplo, dentro de una célula, un sujeto, un animal o un ser humano.

[0035] Tal como se utiliza en el presente documento, "complementario" en referencia a un oligonucleótido significa que al menos el 70% de las nucleobases del oligonucleótido o de una o más porciones del mismo y las nucleobases de otro ácido nucleico o de una o más porciones del mismo son capaces de formar enlaces de hidrógeno entre sí cuando la secuencia de nucleobases del oligonucleótido y del otro ácido nucleico están alineadas en direcciones opuestas. Como se utiliza aquí, "nucleobases complementarias" significa nucleobases que son capaces de formar enlaces de hidrógeno entre sí. Los pares de nucleobases complementarias incluyen la adenina (A) y la timina (T), la adenina (A) y el uracilo (U), la citosina (C) y la guanina (G), y la 5-metil citosina (^mC) y la guanina (G). No es necesario que los oligonucleótidos complementarios y/o los ácidos nucleicos diana tengan complementariedad de nucleobase en cada nucleósido. Más bien se toleran algunos desajustes. Tal como se utiliza aquí, "totalmente complementario" o "100% complementario" en referencia a un oligonucleótido, o a una porción del mismo, significa que el oligonucleótido, o la porción del mismo, es complementario a otro oligonucleótido o ácido nucleico diana en cada nucleobase del más corto de los dos oligonucleótidos, o en cada nucleósido si los oligonucleótidos tienen la misma longitud.

[0036] Tal como se utiliza en el presente documento, "grupo conjugado" significa un grupo de átomos que está unido directa o indirectamente a un oligonucleótido. Los grupos conjugados incluyen una fracción conjugada y un enlazador conjugado que une la fracción conjugada al oligonucleótido.

[0037] Tal como se utiliza en el presente documento, "enlazador conjugado" significa un enlace simple o un grupo de átomos que comprende al menos un enlace que conecta una fracción conjugada a un oligonucleótido.

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, por "fracción conjugada" se entiende un grupo de átomos que se une a un oligonucleótido mediante un enlazador conjugado.

[0039] Tal como se utiliza en el presente documento, "contiguo" en el contexto de un oligonucleótido se refiere a nucleósidos, nucleobases, fracciones de azúcar o enlaces internucleósidos que son inmediatamente adyacentes entre sí. Por ejemplo, "nucleobases contiguas" significa nucleobases que son inmediatamente adyacentes entre sí en una secuencia.

[0040] Como se utiliza en el presente documento, "población quiralmente enriquecida" significa una pluralidad de moléculas de fórmula molecular idéntica, en la que el número o porcentaje de moléculas dentro de la población que contienen una configuración estereoquímica particular en un centro quiral particular es mayor que el número o porcentaje de moléculas que se espera que contengan la misma configuración estereoquímica particular en el mismo centro quiral particular dentro de la población si el centro quiral particular fuera estereorándomico. Las poblaciones enriquecidas quiralmente de moléculas que tienen múltiples centros quirales dentro de cada molécula pueden contener uno o más centros quirales estereorándomicos. En ciertas realizaciones, las moléculas son oligonucleótidos modificados. En ciertas realizaciones, las moléculas son compuestos que comprenden oligonucleótidos modificados.

[0041] Tal como se utiliza en el presente documento, "controlado quiralmente" en referencia a un enlace internucleósido significa que la quiralidad en ese enlace está enriquecida para una configuración estereoquímica particular.

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, "región deoxi" significa una región de 5-12 nucleótidos contiguos, en la que al menos el 70% de los nucleósidos son 2'-β-D-desoxinucleósidos. En ciertas realizaciones, cada nucleósido se selecciona entre un 2'-β-D-desoxinucleósido, un nucleósido bicíclico y un nucleósido sustituido en 2'. En ciertas realizaciones, una región deoxi soporta la actividad ARNasa H. En ciertas realizaciones, una región deoxi es el espacio o región interna de un *gapmer*.

[0043] Tal como se utiliza en el presente documento, "*gapmer*" significa un oligonucleótido modificado que comprende una región interna que tiene una pluralidad de nucleósidos que soportan la escisión de la ARNasa H posicionados entre regiones externas que tienen uno o más nucleósidos, en el que los nucleósidos que comprenden la región interna son químicamente distintos del nucleósido o nucleósidos que comprenden las regiones externas. La región interna puede denominarse "espacio" y las regiones externas "alas". La región interna es una región deoxi. Las posiciones de la región interna o espacio se refieren al orden de los nucleósidos de la región interna y se cuentan empezando por el extremo 5' de la región interna. Salvo que se indique lo contrario, "*gapmer*" se refiere a un motivo de azúcar. En ciertas realizaciones, cada nucleósido del espacio es un 2'-β-D-desoxinucleósido. La laguna según la divulgación puede comprender un nucleósido sustituido en 2' en la posición 1, 2, 3, 4 o 5 del espacio, y el resto de los nucleósidos de la laguna son 2'-β-D-desoxinucleósidos. Tal como se utiliza aquí, el término "*gapmer* MOE" indica un *gapmer* que tiene un espacio que comprende 2'-β-D-desoxinucleósidos y alas que comprenden nucleósidos 2'-MOE. Tal como se utiliza aquí, el término "*gapmer* de alas mixtas" indica un *gapmer* que tiene alas que comprenden nucleósidos modificados que comprenden al menos dos modificaciones de azúcar diferentes. A menos que se indique lo contrario, un *gapmer* puede comprender uno o más enlaces internucleósidos modificados y/o nucleobases modificadas y tales modificaciones no siguen necesariamente el patrón *gapmer* de las modificaciones de azúcar.

[0044] Tal como se utiliza en el presente documento, una "región caliente" es un intervalo de nucleobases en un ácido

nucleico diana que es susceptible de reducción mediada por un compuesto oligomérico de la cantidad o actividad del ácido nucleico diana.

5 **[0045]** Como se usa aquí, "hibridación" significa el apareamiento o recocido de oligonucleótidos y/o ácidos nucleicos complementarios. Aunque no se limita a un mecanismo concreto, el mecanismo más común de hibridación implica el enlace de hidrógeno, que puede ser enlace de hidrógeno Watson-Crick, Hoogsteen o Hoogsteen invertido, entre nucleobases complementarias.

10 **[0046]** Como se usa aquí, "Hipertensión" o "HTN" se refiere a una condición médica crónica donde la presión sanguínea en un animal es elevada. La presión arterial elevada obliga al corazón a trabajar más para hacer circular la sangre por los vasos sanguíneos. Se considera que existe hipertensión arterial cuando ésta se sitúa de forma persistente en un valor igual o superior a 130/80 mmHg (Estadio 1) o a 140/90 mmHg (Estadio 2). La hipertensión se clasifica en primaria (esencial) o secundaria. La hipertensión primaria no tiene una causa clara y se cree que está relacionada con la genética, la dieta, la falta de ejercicio y la obesidad. La hipertensión secundaria está causada por otra enfermedad. La hipertensión es un importante factor de riesgo de acortamiento de la esperanza de vida, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, aneurismas de los vasos sanguíneos (por ejemplo, aneurisma aórtico), arteriopatía periférica, daño orgánico (por ejemplo, agrandamiento o hipertrofia del corazón) y otras enfermedades cardiovasculares, trastornos y/o afecciones o síntomas de las mismas. Los fármacos antihipertensivos, los cambios en la dieta y los cambios en el estilo de vida pueden reducir la hipertensión y reducir las enfermedades, trastornos y/o afecciones asociadas a la hipertensión. La hipertensión puede ser no resistente a la intervención farmacológica (es decir, controlable mediante los tratamientos farmacológicos disponibles en el mercado) o resistente a la intervención farmacológica.

25 **[0047]** Como se usa aquí, "enlace internucleósido" significa el enlace covalente entre nucleósidos contiguos en un oligonucleótido. En el presente documento, por "enlace internucleósido modificado" se entiende cualquier enlace internucleósido distinto de un enlace internucleósido fosfodiéster. "Enlace internucleósido fosforotioato" es un enlace internucleósido modificado en el que uno de los átomos de oxígeno no puenteantes de un enlace internucleósido fosfodiéster se sustituye por un átomo de azufre.

30 **[0048]** Tal como se utiliza en el presente documento, "nucleósido enlazador" significa un nucleósido que enlaza, directa o indirectamente, un oligonucleótido a una fracción conjugada. Los nucleósidos enlazadores se encuentran dentro del enlazador conjugado de un compuesto oligomérico. Los nucleósidos enlazadores no se consideran parte de la porción oligonucleotídica de un compuesto oligomérico aunque sean contiguos al oligonucleótido.

35 **[0049]** Tal como se utiliza en el presente documento, por "fracción de azúcar modificada no bicíclica" se entiende una fracción de azúcar modificada que comprende una modificación, como un sustituyente, que no forma un puente entre dos átomos del azúcar para formar un segundo anillo.

40 **[0050]** Tal como se utiliza en el presente documento, "no ajustado" o "no complementario" significa una nucleobase de un primer oligonucleótido que no es complementaria con la nucleobase correspondiente de un segundo oligonucleótido o ácido nucleico diana cuando el primer y el segundo oligonucleótido están alineados.

45 **[0051]** Tal como se utiliza en el presente documento, "motivo" significa el patrón de fracciones, nucleobases y/o enlaces internucleósidos de azúcares no modificados y/o modificados en un oligonucleótido.

50 **[0052]** Tal como se utiliza aquí, "nucleobase" significa una nucleobase no modificada o una nucleobase modificada. Tal como se utiliza aquí, una "nucleobase no modificada" es adenina (A), timina (T), citosina (C), uracilo (U) o guanina (G). Tal como se utiliza en el presente documento, una "nucleobase modificada" es un grupo de átomos distintos de A, T, C, U o G no modificados capaces de emparejarse con al menos una nucleobase no modificada. Una "5-metil citosina" es una nucleobase modificada. Una base universal es una nucleobase modificada que puede emparejarse con cualquiera de las cinco nucleobases no modificadas. Tal como se utiliza en el presente documento, por "secuencia de nucleobases" se entiende el orden de las nucleobases contiguas en un ácido nucleico u oligonucleótido diana, independientemente de cualquier modificación del azúcar o del enlace internucleósido.

55 **[0053]** Como se usa aquí, "nucleósido" significa un compuesto, o un fragmento de un compuesto, que comprende una nucleobase y una fracción de azúcar. La nucleobase y la fracción de azúcar están, cada una independientemente, no modificadas o modificadas. Como se usa aquí, "nucleósido modificado" significa un nucleósido que comprende una nucleobase modificada y/o una fracción de azúcar modificado. Los nucleósidos modificados incluyen los nucleósidos abásicos, que carecen de una nucleobase. "Nucleósidos enlazados" son nucleósidos que están conectados en una secuencia contigua (es decir, no se presentan nucleósidos adicionales entre los que están enlazados).

60 **[0054]** Como se usa aquí, "compuesto oligomérico" significa un oligonucleótido y opcionalmente una o más características adicionales, tales como un grupo conjugado o un grupo terminal. Un compuesto oligomérico puede estar emparejado con un segundo compuesto oligomérico que sea complementario del primer compuesto oligomérico o puede no estar emparejado. Un "compuesto oligomérico monocatenario" es un compuesto oligomérico no apareado. Por "dúplex oligomérico" se entiende un dúplex formado por dos compuestos oligoméricos que tienen secuencias de nucleobases

complementarias. Cada compuesto oligomérico de un dúplex oligomérico puede denominarse "compuesto oligomérico duplexado".

[0055] Tal como se utiliza en el presente documento, "oligonucleótido" significa una cadena de nucleósidos enlazados conectados mediante enlaces internucleósidos, en la que cada nucleósido y enlace internucleósido puede estar modificado o no modificado. A menos que se indique lo contrario, los oligonucleótidos constan de 8-50 nucleósidos enlazados. Como se utiliza aquí, "oligonucleótido modificado" significa un oligonucleótido, en el que al menos un nucleósido o enlace internucleósido está modificado. Como se utiliza aquí, "oligonucleótido no modificado" significa un oligonucleótido que no comprende ninguna modificación nucleosídica o modificación internucleosídica.

[0056] Tal como se utiliza en el presente documento, "daño en órganos" o "daño en órganos finales" se refiere al daño que se produce en los órganos principales alimentados por el sistema circulatorio, como el corazón (p. ej., hipertrofia del músculo cardíaco, reducción de la función cardíaca y/o insuficiencia cardíaca), el riñón (p. ej., albuminurea, proteinurea, reducción de la función renal y/o insuficiencia renal), los ojos (p. ej., retinopatía hipertensiva), el cerebro (p. ej., apoplejía) y similares. La hipertensión puede dañar los órganos de un animal. En ciertas realizaciones, el daño cardíaco es fibrosis, hipertrofia de las células cardíacas y/o del músculo que conduce a un agrandamiento del corazón.

[0057] Como se usa aquí, "portador o diluyente farmacéuticamente aceptable" significa cualquier sustancia adecuada para su uso en la administración a un sujeto. Algunos de estos portadores permiten que las composiciones farmacéuticas se formulen, por ejemplo, como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones y pastillas para la ingestión oral por un sujeto. En ciertas realizaciones, un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable es agua estéril, solución salina estéril, solución tampón estéril o líquido cefalorraquídeo artificial estéril.

[0058] Tal como se utiliza aquí, "sales farmacéuticamente aceptables" significa sales fisiológica y farmacéuticamente aceptables de compuestos. Las sales farmacéuticamente aceptables conservan la actividad biológica deseada del compuesto original y no le confieren efectos toxicológicos no deseados.

[0059] Tal como se utiliza en el presente documento, por "composición farmacéutica" se entiende una mezcla de sustancias adecuadas para su administración a un sujeto. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender un compuesto oligomérico y una solución acuosa estéril. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica muestra actividad en el ensayo de captación libre en ciertas líneas celulares.

[0060] Tal como se utiliza aquí, "profármaco" significa un agente terapéutico en una forma externa al cuerpo que se convierte a una forma diferente dentro de un sujeto o de sus células. Normalmente, la conversión de un profármaco en el sujeto se ve facilitada por la acción de enzimas (por ejemplo, enzimas endógenas o virales) o sustancias químicas presentes en células o tejidos y/o por condiciones fisiológicas.

[0061] Tal como se utiliza en el presente documento, "reducir la cantidad o actividad" se refiere a una reducción o bloqueo de la expresión o actividad transcripcional en relación con la expresión o actividad transcripcional en una muestra no tratada o de control y no indica necesariamente una eliminación total de la expresión o actividad transcripcional.

[0062] En el presente documento, "sistema renina-angiotensina-aldosterona", "vía del sistema renina-angiotensina-aldosterona", "vía RAAS" o "RAAS" se refieren a una vía enzimática multicomponente en la que un componente precursor (angiotensinógeno) es convertido por diversas enzimas como la renina y la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en componentes posteriores como la angiotensina I y la angiotensina II. La angiotensina I estimula la secreción del esteroide aldosterona en la vía. La vía del RAAS regula la presión arterial y el equilibrio de líquidos.

[0063] Tal como se utiliza en el presente documento, "sistema renina-angiotensina", o "RAS" o "vía RAS" se refieren a una parte de la vía RAAS. Varios componentes de esta vía han sido objeto de agonistas o antagonistas para bloquear su producción. Por ejemplo, se han desarrollado inhibidores de la renina, inhibidores de la ACE, bloqueantes de los receptores de la angiotensina (ARB) y similares para inhibir o bloquear la vía del RAS. Sin embargo, las terapias disponibles comercialmente dirigidas a diversos componentes de la vía RAS han sido ineficaces para inhibir o bloquear completamente la vía RAS debido a diversos mecanismos o efectos adversos (Nobakht et al., Nat Rev Nephrol, 2011, 7:356-359).

[0064] Tal como se utiliza en el presente documento, "enfermedad, trastorno y/o afección relacionados con el RAAS" o "enfermedad, trastorno y/o afección relacionados con la vía del RAAS" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o afección relacionados con el RAAS en un animal. Entre los ejemplos de enfermedades, trastornos y/o afecciones relacionados con el RAAS se incluyen la reducción de la esperanza de vida, la hipertensión (por ejemplo, hipertensión no resistente, hipertensión resistente), la enfermedad renal (por ejemplo, enfermedad renal crónica, enfermedad renal poliquística), el ictus, la enfermedad cardíaca (por ejemplo, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, cardiopatía valvular), aneurismas de los vasos sanguíneos (por ejemplo, aneurisma aórtico), arteriopatía periférica, daño orgánico (por ejemplo, daño cardíaco o hipertrofia), fibrosis tisular y otras enfermedades, trastornos y/o afecciones cardiovasculares o sus síntomas. En ciertas realizaciones, la enfermedad, trastorno y/o afección relacionada con el RAAS no incluye la hipertensión.

5 [0065] Tal como se utiliza en el presente documento, la "hipertensión resistente" o "RHTN" se define como a) presión arterial por encima del objetivo terapéutico (normalmente $\geq 130/80$ mmHg) a pesar del uso simultáneo de 3 o más agentes antihipertensivos de diferentes clases de fármacos administrados a las dosis máximas toleradas; o b) presión arterial que se controla en o por debajo del objetivo terapéutico sólo después de la administración de al menos 4 agentes antihipertensivos de diferentes clases para lograr el control.

[0066] Tal como se utiliza en el presente documento, "ARN" significa un transcrito de ARN e incluye el ARNpre-m y el ARNm maduro, a menos que se especifique lo contrario.

10 [0067] Tal como se utiliza en el presente documento, "compuesto de ARNi" significa un compuesto antisentido que actúa, al menos en parte, a través de RISC o Ago2 para modular un ácido nucleico diana y/o una proteína codificada por un ácido nucleico diana. Los compuestos de ARNi incluyen, entre otros, el ARNsi bicatenario, el ARN monocatenario (ARNss) y el microARN, incluidos los imitadores de microARN. En ciertas realizaciones, un compuesto de ARNi modula la cantidad, la actividad y/o el empalme de un ácido nucleico diana. El término compuesto de ARNi excluye los compuestos antisentido
15 que actúan a través de la ARNasa H.

[0068] Tal como se utiliza en el presente documento, "autocomplementario" en referencia a un oligonucleótido significa un oligonucleótido que al menos parcialmente hibrida consigo mismo.

20 [0069] Tal como se utiliza en el presente documento, por "ensayo *in vitro* estándar" se entienden los ensayos descritos en los Ejemplos y las variaciones razonables de los mismos.

[0070] Tal como se utiliza en el presente documento, por "ensayo *in vivo* estándar" se entienden los ensayos descritos en los Ejemplos y las variaciones razonables de los mismos.

25 [0071] Tal como se utiliza en el presente documento, "centro quiral estereorándomico" en el contexto de una población de moléculas de fórmula molecular idéntica significa un centro quiral que tiene una configuración estereoquímica aleatoria. Por ejemplo, en una población de moléculas que comprenden un centro quiral estereorándomico, el número de moléculas que tienen la configuración (S) del centro quiral estereorándomico puede ser pero no es necesariamente el mismo que el
30 número de moléculas que tienen la configuración (R) del centro quiral estereorándomico. La configuración estereoquímica de un centro quiral se considera aleatoria cuando es el resultado de un método sintético que no está diseñado para controlar la configuración estereoquímica. En ciertas realizaciones, un centro quiral estereorándomico es un enlace internucleósido fosforotioato estereorándomico.

35 [0072] Tal como se usa en el presente documento, "sujeto" significa un animal humano o no humano.

[0073] Tal como se utiliza en el presente documento, por "fracción de azúcar" se entiende una fracción de azúcar no modificado o una fracción de azúcar modificado. Tal como se utiliza en el presente documento, por "fracción de azúcar no modificada" se entiende una fracción de β -D-ribosilo 2'-OH(H), tal como se encuentra en el ARN (una "fracción de
40 azúcar de ARN no modificada"), o una fracción de azúcar de β -D-desoxirribosilo 2'-H(H), tal como se encuentra en el ADN (una "fracción de azúcar de ADN no modificada"). Las fracciones de azúcar no modificado tienen un hidrógeno en cada una de las posiciones 1', 3' y 4', un oxígeno en la posición 3' y dos hidrógenos en la posición 5'. En el presente documento, por "fracción de azúcar modificado" o "azúcar modificado" se entiende una fracción de azúcar furanosil modificado un
45 sucedáneo de azúcar.

[0074] Tal como se usa en el presente documento, "sustituto de azúcar" significa una fracción de azúcar modificado que no tiene una fracción de furanosil que puede enlazar una nucleobase a otro grupo, como un enlace internucleósido, un grupo conjugado o un grupo terminal en un oligonucleótido. Los nucleósidos modificados que comprenden sustitutos de
50 azúcar pueden incorporarse en una o más posiciones dentro de un oligonucleótido y dichos oligonucleótidos son capaces de hibridarse con compuestos oligoméricos complementarios o ácidos nucleicos diana.

[0075] Tal como se utiliza en el presente documento, "síntoma" o "sello distintivo" significa cualquier característica física o resultado de una prueba que indique la existencia o el alcance de una enfermedad o trastorno. En ciertas realizaciones, un síntoma es evidente para un sujeto o para un profesional médico que examina o realiza pruebas al sujeto. En ciertas
55 realizaciones, un sello distintivo es aparente tras pruebas diagnósticas invasivas, incluyendo, pero sin limitarse a, pruebas post-mortem.

[0076] Tal como se utiliza en el presente documento, "ácido nucleico diana" y "ARN diana" significan un ácido nucleico que un compuesto antisentido está diseñado para afectar.

60 [0077] Tal como se utiliza en el presente documento, "región diana" significa una porción de un ácido nucleico diana al que un compuesto oligomérico está diseñado para hibridarse.

[0078] Tal como se utiliza en el presente documento, "grupo terminal" significa un grupo químico o grupo de átomos que
65 está unido covalentemente a un extremo de un oligonucleótido.

[0079] Como se usa aquí, "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de un agente farmacéutico que proporciona un beneficio terapéutico a un sujeto. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz mejora un síntoma de una enfermedad.

5 **ALGUNAS REALIZACIONES**

[0080]

Realización 1. Un compuesto oligomérico según la siguiente estructura química:

10

15

20

25

30

35

40

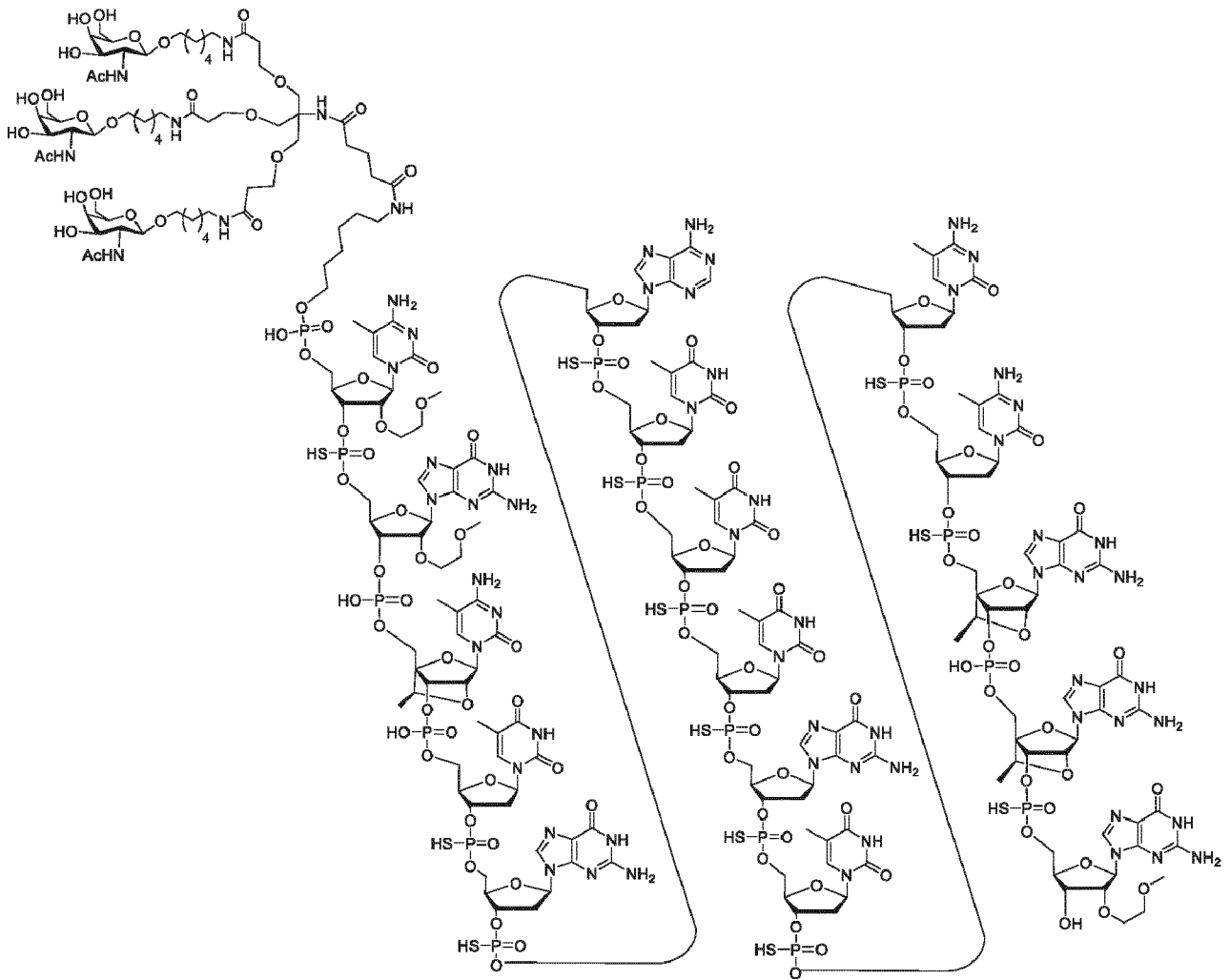
45

50

55

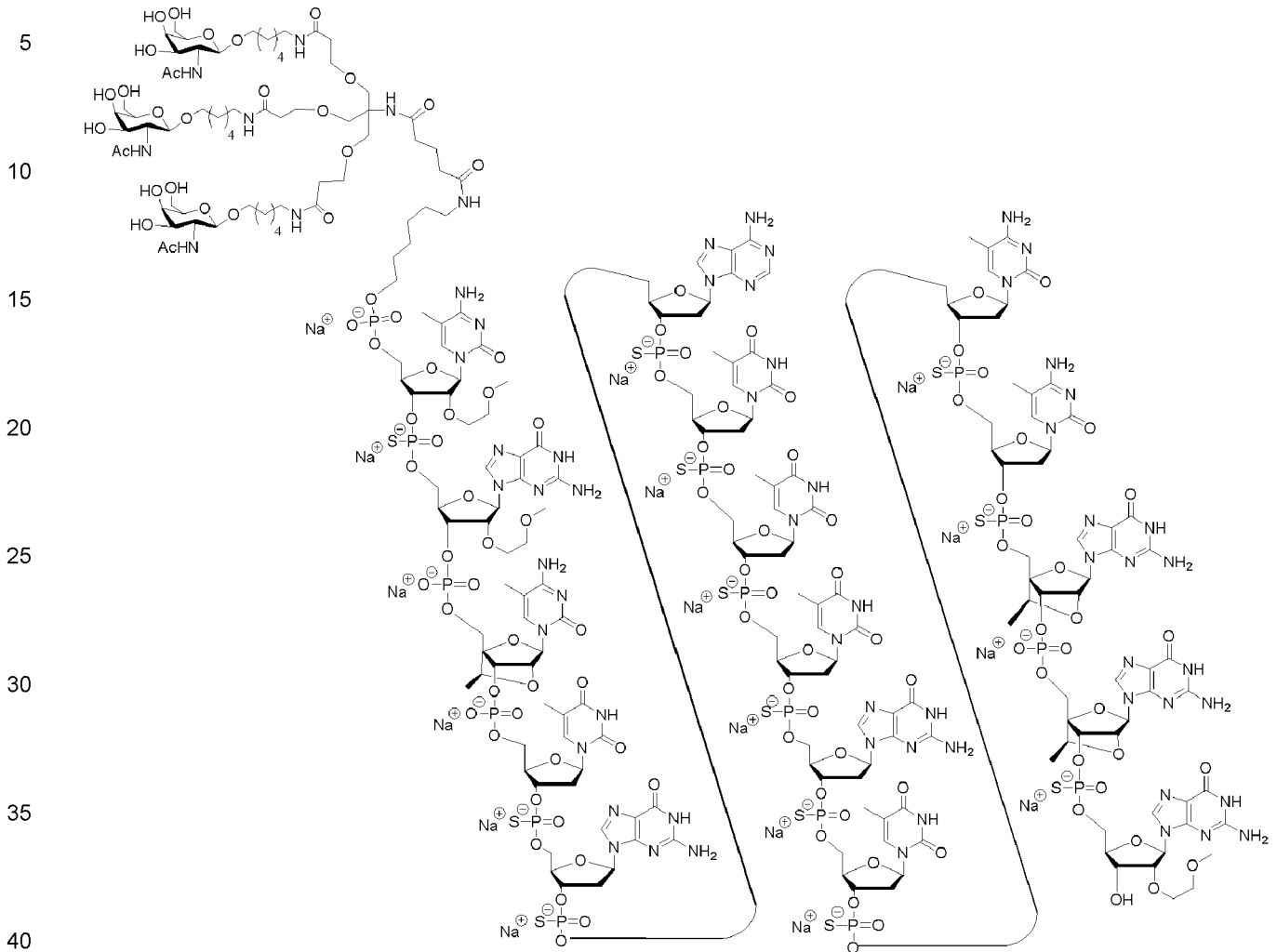
60

65



(SEQ ID N.º: o una sal del mismo.

Realización 2. Un compuesto oligomérico según la siguiente estructura química:



(SEQ ID N.º: 12).

Realización 3. El compuesto oligomérico de la realización 1, que es la sal sódica o la sal potásica.

Realización 4. Un compuesto oligomérico que comprende un oligonucleótido modificado según la siguiente notación química: ${}^m\text{C}_{\text{es}}\text{G}_{\text{eo}}{}^m\text{C}_{\text{ko}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{A}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ds}}\text{T}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{ds}}{}^m\text{C}_{\text{ds}}\text{G}_{\text{ko}}\text{G}_{\text{ks}}\text{G}_{\text{e}}$ (SEQ ID N.º: 12), en la que:

- A = una nucleobase de adenina,
- ${}^m\text{C}$ = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- e = una fracción de azúcar 2'-β-D-MOE,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- s = un enlace internucleósido fosforotioato, y
- o = un enlace fosfodiéster internucleósido.

Realización 5. El compuesto oligomérico de la realización 4, que comprende el oligonucleótido modificado unido covalentemente a un grupo conjugado.

Realización 6. Una población de compuestos oligoméricos de cualquiera de las realizaciones 1-5, en la que todos los enlaces internucleósidos fosforotioato del compuesto oligomérico son estereorándomicos.

Realización 7. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico de cualquiera de las realizaciones 1-5, o la población de la realización 6 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Realización 8. Una composición farmacéutica para uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada con la vía RAAS, que comprende administrar a un individuo que tiene o está en riesgo de tener una enfermedad asociada con la vía RAAS una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica según la Realización 14, tratando así la enfermedad asociada con la vía RAAS, donde:

(i) la enfermedad es una enfermedad cardiovascular; y/o(ii) la enfermedad se selecciona entre hipertensión, hipertensión resistente, síndrome de Marfan, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal, obesidad, síndrome metabólico, NASH y NAFLD.

Realización 9. La composición farmacéutica para uso según la realización 8, en la que se mejora al menos un síntoma o sello distintivo de la enfermedad, en la que el síntoma o sello distintivo es cualquiera de hipertensión, emergencia hipertensiva (es decir, hipertensión maligna), accidente cerebrovascular, preeclampsia, aneurismas de los vasos sanguíneos, aneurisma abdominal, enfermedad arterial periférica, daño orgánico o hipertensión arterial pulmonar.

Realización 10. La composición farmacéutica para uso según la realización 8 o la realización 9, en la que la composición farmacéutica se administra sistémicamente.

Realización 11. La composición farmacéutica para uso según la realización 10, en la que la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea o intramuscular.

I. Ciertos Oligonucleótidos

[0081] Se divulgan en el presente documento compuestos oligoméricos que comprenden oligonucleótidos, que consisten en nucleósidos enlazados. Los oligonucleótidos pueden ser oligonucleótidos no modificados (ARN o ADN) o pueden ser oligonucleótidos modificados. Los oligonucleótidos modificados comprenden al menos una modificación relativa al ARN o ADN no modificados. Es decir, los oligonucleótidos modificados comprenden al menos un nucleósido modificado (que comprende una fracción de azúcar modificada y/o una nucleobase modificada) y/o al menos un enlace internucleósido modificado.

A. Ciertos Nucleósidos Modificados

[0082] Los nucleósidos modificados comprenden una fracción de azúcar modificado o una nucleobase modificada o ambas, una fracción de azúcar modificado y una nucleobase modificada.

1. Ciertas Fracciones de Azúcar

[0083] Las fracciones de azúcar modificadas pueden ser fracciones de azúcar modificado no bicíclico. Los azúcares modificados pueden ser bicíclicos o tricíclicos. Los azúcares modificados pueden ser sustitutos del azúcar. Dichos sustitutos del azúcar pueden comprender una o más sustituciones correspondientes a las de otros tipos de fracciones de azúcar modificado.

[0084] Las fracciones de azúcar modificado pueden ser fracciones de azúcar modificado no bicíclico que comprenden un anillo furanosilo con uno o más grupos sustituyentes ninguno de los cuales une dos átomos del anillo furanosilo para formar una estructura bicíclica. Dichos sustituyentes no puente pueden estar en cualquier posición del furanosilo, incluyendo pero no limitándose a sustituyentes en las posiciones 2', 4', y/o 5'. Uno o más sustituyentes no puente de los azúcares modificados no bicíclicos pueden ser ramificados. Algunos ejemplos de grupos sustituyentes en 2' adecuados para las fracciones de azúcares modificados no bicíclicos son, entre otros: 2'-F, 2'-OCH₃ ("OMe" u "O-metilo"), y 2'-O(CH₂)₂OCH₃ ("MOE" u "O-metoxietilo"). Los grupos sustituyentes en 2' pueden seleccionarse entre: halo, alilo, amino, azido, SH, CN, OCN, CF₃, OCF₃, alcoxi O-C₁-C₁₀, alcoxi O-C₁-C₁₀ sustituido, alquilo O-C₁-C₁₀, alquilo O-C₁-C₁₀ sustituido, S-alquilo, N(R_m)-alquilo, O-alquenoilo, S-alquenoilo, N(R_m)-alquenoilo, O-alquinoilo, S-alquinoilo, N(R_m)-alquinoilo, O-alquinoilo, S-alquinoilo, N(R_m)-alquinoilo, O-alquilenil-O-alquilo, alquinoilo, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo, O-alquilo, O-alquilo, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n) o OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H, un grupo amino protector, o alquilo C₁-C₁₀ sustituido o no sustituido, y los grupos sustituyentes en 2' en Cook et al., U.S. 6,531,584; Cook et al., U.S. 5,859,221; y Cook et al., U.S. 6,005,087. Ciertos aspectos de estos grupos sustituyentes en 2' pueden estar además sustituidos con uno o más grupos sustituyentes seleccionados independientemente de entre: hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro (NO₂), tiol, tioalcoxi, tioalquilo, halógeno, alquilo, arilo, alquenoilo y alquinoilo. Los ejemplos de grupos 4'-sustituyentes adecuados para fracciones de azúcar modificado no bicíclico incluyen, entre otros, alcoxi (*p. ej.*, metoxi), alquilo y los descritos en Manoharan et al., documento WO 2015/106128. Algunos ejemplos de grupos sustituyentes 5' adecuados para las fracciones de azúcares modificados no bicíclicos son, entre otros: 5'-metilo (R o S), 5'-vinilo y 5'-metoxi. Las fracciones de azúcar modificado no bicíclico pueden comprender más de un sustituyente de azúcar no puenteante, por ejemplo, fracciones de azúcar 2'-F-5'-metil y las fracciones de azúcar modificado y nucleósidos

modificados descritos en Migawa et al., WO 2008/101157 y Rajeev et al., US2013/0203836.

[0085] Un nucleósido modificado no bicíclico sustituido en 2' puede comprender una molécula de azúcar que comprende un grupo sustituyente en 2' no puente seleccionado entre: F, NH₂, N₃, OCF₃, OCH₃, O(CH₂)₃NH₂, CH₂CH=CH₂, OCH₂CH=CH₂, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(R_m)(R_n), O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y acetamida N-sustituida (OCH₂C(=O)-N(R_m)(R_n)), donde cada R_m y R_n es, independientemente, H, un grupo protector amino, o alquilo C₁-C₁₀sustituido o no sustituido.

[0086] Un nucleósido modificado no bicíclico sustituido en 2' puede comprender una fracción de azúcar que comprenda un grupo sustituyente en 2' no puente seleccionado entre: F, OCF₃, OCH₃, OCH₂CH₂OCH₃, O(CH₂)₂SCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)₂O(CH₂)₂N(CH₃)₂, y OCH₂C(=O)-N(H)CH₃ ("NMA").

[0087] Un nucleósido modificado no bicíclico sustituido en 2' puede comprender una molécula de azúcar que comprende un grupo sustituyente en 2' no puente seleccionado entre: F, OCH₃, y OCH₂CH₂OCH₃.

[0088] Las fracciones de azúcar furanosílico modificado y los nucleósidos que incorporan dichas fracciones de azúcar furanosílico modificado pueden definirse además por configuración isomérica. Por ejemplo, una fracción de azúcar 2'-desoxifuranosil puede estar en siete configuraciones isoméricas distintas de la configuración β-D-deoxirribosil natural. Tales fracciones de azúcar modificadas se describen, por ejemplo, en el documento WO 2019/157531. Una fracción de azúcar 2'modificada tiene un estereocentro adicional en la posición 2' con respecto a una fracción de azúcar 2'-desoxifuranosil; por lo tanto, dichas fracciones de azúcar tienen un total de dieciséis configuraciones isoméricas posibles. Las fracciones de azúcar modificadas en 2' descritas en el presente documento se encuentran en la configuración isomérica β-D-ribosil, a menos que se especifique lo contrario.

[0089] Ciertas fracciones de azúcar modificadas comprenden un sustituyente que une dos átomos del anillo furanosilo para formar un segundo anillo, dando lugar a una fracción de azúcar bicíclico. La fracción de azúcar bicíclica puede incluir un puente entre los átomos de anillo de la furanosa 4' y 2'. Ejemplos de tales sustituyentes de azúcares puente de 4' a 2' incluyen, pero no se limitan a: 4'-CH₂-2', 4'-(CH₂)₂-2', 4'-(CH₂)₃-2', 4'-CH₂-O-2' ("LNA"), 4'-CH₂-S-2', 4'-(CH₂)₂-O-2' ("ENA"), 4'-CH(CH₃)-O-2' (denominados "etilo restringido" o "cEt"), 4'-CH₂-O-CH₂-2', 4'-CH₂-N(R)-2', 4'-CH(CH₂OCH₃)-O-2' ("MOE restringido" o "cMOE") y análogos de los mismos (véase, p. ej., Seth et al., U.S. 7,399,845, Bhat et al., U.S. 7,569,686, Swayze et al., U.S. 7,741,457, y Swayze et al., U.S. 8,022,193), 4'-C(CH₃)(CH₃)-O-2' y análogos de los mismos (véase, p. ej., Seth et al., U.S. 8,278,283), 4'-CH₂-N(OCH₃)-2' y análogos de los mismos (véase, p. ej., Prakash et al., U.S. 8,278,425), 4'-CH₂-O-N(CH₃)-2' (véase, p. ej., Allerson et al., U.S. 7,696,345 y Allerson et al., U.S. 8,124,745), 4'-CH₂-C(H)(CH₃)-2' (véase, p. ej., Zhou, et al., J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134), 4'-CH₂-C(=CH₂)-2' y análogos de los mismos (véase, p. ej., Seth et al. 8,278,426), 4'-C(R_aR_b)-N(R)-O-2', 4'-C(R_aR_b)-O-N(R)-2', 4'-CH₂-O-N(R)-2', y 4'-CH₂-N(R)-O-2', donde cada R, R_a, y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C₁-C₁₂ (véase, por ejemplo, Imanishi et al., U.S. 7,427,672).

[0090] Dichos puentes de 4' a 2' pueden comprender independientemente de 1 a 4 grupos enlazados seleccionados independientemente de: -[C(R_a)(R_b)]_n-, -[C(R_a)(R_b)]_n-O-, -C(R_a)=C(R_b)-, -C(R_a)=N-, -C(=NR_a)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R_a)₂-, -S(=O)_x-, y -N(R_a)-; en los que:

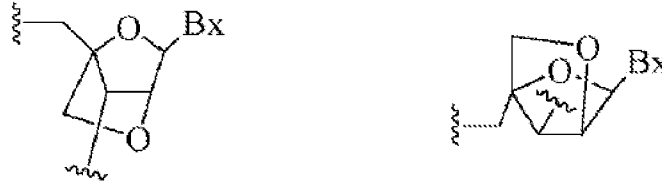
x es 0, 1 ó 2;

n es 1, 2, 3 ó 4;

cada R_a y R_b es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alicíclico C₅-C₇, radical alicíclico C₅-C₇ sustituido, halógeno, OJ₁, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, COOJ₁, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)₂-J₁), o sulfoxilo (S(=O)-J₁); y cada J₁ y J₂ es, independientemente, H, alquilo C₁-C₁₂, alquilo C₁-C₁₂ sustituido, alqueno C₂-C₁₂, alqueno C₂-C₁₂ sustituido, alquino C₂-C₁₂, alquino C₂-C₁₂ sustituido, arilo C₅-C₂₀, arilo C₅-C₂₀ sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C₁-C₁₂, aminoalquilo C₁-C₁₂ sustituido, o un grupo protector.

[0091] Otras fracciones de azúcar bicíclico son conocidas en la técnica, véase, por ejemplo: Freier et al., Nucleic Acids Research, 1997, 25(22), 4429-4443, Albaek et al., J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-7740, Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129, 8362-8379; Wengel et al., U.S. 7,053,207; Imanishi et al., U.S. 6,268,490; Imanishi et al. U.S. 6,770,748; Imanishi et al., U.S. RE44,779; Wengel et al., U.S. 6,794,499; Wengel et al., U.S. 6,670,461; Wengel et al., U.S. 7,034,133; Wengel et al., U.S. 8,080,644; Wengel et al., U.S. 8,034,909; Wengel et al., U.S. 8,153,365; Wengel et al., U.S. 7,572,582; Ramasamy y otros, U.S. 6,525,191; Torsten et al., documento WO 2004/106356; Wengel et al., documento WO 1999/014226; Seth et al., documento WO 2007/134181; Seth et al., U.S. 7,547,684; Seth et al., U.S. 7,666,854; Seth et al., U.S. 8,088,746; Seth et al., U.S. 7,750,131; Seth et al., U.S. 8,030,467; Seth et al., U.S. 8,268,980; Seth et al., U.S. 8,546,556; Seth et al., U.S. 8,530,640; Migawa et al., U.S. 9,012,421; Seth et al., U.S. 8,501,805; y Publicación de Patentes de EE.UU. Allerson et al., US2008/0039618 and Migawa et al., US2015/0191727.

[0092] Las fracciones de azúcares bicíclicas y los nucleósidos que incorporan tales fracciones de azúcares bicíclicas pueden definirse además por su configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido LNA (descrito en el presente documento) puede estar en la configuración α -L o en la configuración β -D.



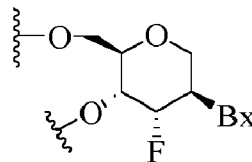
LNA (configuración β -D) α -L-LNA (configuración α -L)
 puente = 4'-CH₂-O-2' puente = 4'-CH₂-O-2'

Se han incorporado nucleósidos bicíclicos α -L-metilenooxi (4'-CH₂-O-2') o α -L-LNA en oligonucleótidos que mostraron actividad antisentido (Frieden et al., Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365-6372). En el presente documento, las descripciones generales de los nucleósidos bicíclicos incluyen ambas configuraciones isoméricas. Cuando las posiciones de nucleósidos bicíclicos específicos (*p. ej.*, LNA o cEt) se identifican en las realizaciones ejemplificadas aquí, están en la configuración β -D, a menos que se especifique lo contrario.

[0093] Las fracciones de azúcar modificadas pueden comprender uno o más sustituyentes de azúcar no puenteantes y uno o más sustituyentes de azúcar puenteantes (por ejemplo, azúcares 5'-sustituídos y 4'-2' puenteantes).

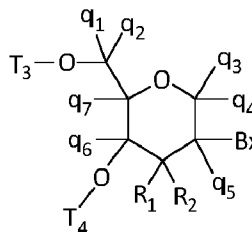
[0094] Las fracciones de azúcar modificadas pueden ser sustitutos de azúcar. El átomo de oxígeno de la fracción de azúcar puede sustituirse, *por ejemplo*, por un átomo de azufre, carbono o nitrógeno. Dichas fracciones de azúcar modificadas también pueden incluir sustituyentes puente y/o no puente, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, algunos sustitutos del azúcar contienen un átomo de azufre 4' y una sustitución en la posición 2' (*véase, p. ej.*, Bhat et al., U.S. 7,875,733 y Bhat et al., U.S. 7,939,677) y/o la posición 5'.

[0095] Los sustitutos del azúcar pueden comprender anillos que tengan menos de 5 átomos. Por ejemplo, un sustituto del azúcar puede comprender un tetrahidropirano ("THP") de seis miembros. Estos tetrahidropiranos pueden modificarse o sustituirse. Los nucleósidos que comprenden dichos tetrahidropiranos modificados incluyen, entre otros, el ácido nucleico de hexitol ("HNA"), el ácido nucleico de anitol ("ANA"), el ácido nucleico de manitol ("MNA") (*véase, p. ej.*, Leumann, C.J. Bioorg. & Med. Chem. 2002, 10, 841-854), fluoro HNA:



F-HNA

("F-HNA", *véase p. ej.* Swayze et al., U.S. 8,088,904; Swayze et al., U.S. 8,440,803; Swayze et al., U.S. 8,796,437; y Swayze et al., U.S. 9,005,906; el F-HNA también puede denominarse F-THP o 3'-fluoro tetrahidropirano), y nucleósidos que comprenden compuestos THP modificados adicionales que tienen la fórmula:



donde, independientemente, para cada uno de los nucleósidos THP modificados:

Bx es una fracción de nucleobase;
 T₃ y T₄ son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido

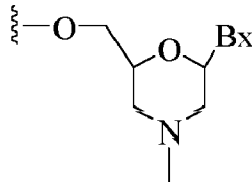
THP modificado al resto de un oligonucleótido o uno de T₃ y T₄ es un grupo de enlace internucleósido que enlaza el nucleósido THP modificado al resto de un oligonucleótido y el otro de T₃ y T₄ es H, un grupo protector hidroxilo, un grupo conjugado enlazado, o un grupo 5' o 3'-terminal; q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno, independientemente, H, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₆ sustituido, alqueno C₂-C₆, alqueno C₂-C₆ sustituido, alquino C₂-C₆, o alquino C₂-C₆ sustituido; y cada uno de R₁ y R₂ se selecciona independientemente entre: hidrógeno, halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ₁J₂, SJ₁, N₃, OC(=X)J₁, OC(=X)NJ₁J₂, NJ₃C(=X)NJ₁J₂, y CN, en el que X es O, S o NJ₁, y cada J₁, J₂, y J₃ es, independientemente, H o alquilo C₁-C₆.

5

[0096] Pueden proporcionarse nucleósidos THP modificados en los que q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ son cada uno H. Al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ puede ser distinto de H. Al menos uno de q₁, q₂, q₃, q₄, q₅, q₆ y q₇ puede ser metilo. Se dan a conocer nucleósidos THP modificados en los que uno de R₁ y R₂ puede ser F. R₁ puede ser F y R₂ puede ser H, R₁ puede ser metoxi y R₂ puede ser H, y R₁ puede ser metoxietoxi y R₂ puede ser H.

[0097] Los sustitutos del azúcar pueden comprender anillos que tengan más de 5 átomos y más de un heteroátomo. Por ejemplo, se han descrito nucleósidos que comprenden fracciones de azúcar morfolino y su uso en oligonucleótidos (véase, por ejemplo, Braasch et al., *Biochemistry*, 2002, 41, 4503-4510 y Summerton et al., U.S. 5,698,685; Summerton et al., U.S. 5,166,315; Summerton et al., U.S. 5,185,444; y Summerton et al., U.S. 5,034,506). Como se utiliza aquí, el término "morfolino" significa un sustituto del azúcar que tiene la siguiente estructura:

20



25

Los morfolinos pueden modificarse, por ejemplo, añadiendo o alterando varios grupos sustituyentes de la estructura del morfolino anterior. Tales sustitutos del azúcar se denominan aquí "morfolinos modificados".

30

[0098] Los sustitutos del azúcar pueden comprender fracciones acíclicas. Ejemplos de nucleósidos y oligonucleótidos que comprenden dichos sustitutos de azúcares acíclicos incluyen, entre otros: ácido nucleico peptídico ("PNA"), ácido nucleico butílico acíclico (véase, p. ej., Kumar et al., *Org. Biomol. Chem.*, 2013, 11, 5853-5865), y nucleósidos y oligonucleótidos descritos en Manoharan et al., documento WO2011/133876.

35

[0099] Se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillos de azúcar y sustitutos de azúcar bicíclicos y tricíclicos que pueden utilizarse en nucleósidos modificados).

40 **2. Ciertas Nucleobases Modificadas**

[0100] Los oligonucleótidos modificados de la invención comprenden nucleósidos que comprenden una nucleobase no modificada, como se define en las reivindicaciones. Los oligonucleótidos modificados de la invención comprenden nucleósidos que comprenden una nucleobase modificada, como se define en las reivindicaciones. Se dan a conocer oligonucleótidos modificados que comprenden uno o más nucleósidos que no comprenden una nucleobase, denominados nucleósidos abásicos.

45

[0101] Las nucleobases modificadas pueden seleccionarse entre: pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas, pirimidinas sustituidas en alquilo o alquino, purinas sustituidas en alquilo y purinas sustituidas en N-2, N-6 y O-6. Las nucleobases modificadas pueden seleccionarse entre: 2-aminopropiladenina, 5-hidroximetilcitosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-N-metilguanina, 6-N-metiladenina, 2-propiladenina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-propinil (-C≡C-CH₃) uracilo, 5-propinilcitosina, 6-azouracilo, 6-azocitosina, 6-azotimina, 5-ribosiluracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo, 8-aza y otras purinas sustituidas en 8, 5-halo, en particular 5-bromo, 5-trifluorometil, 5-halouracilo y 5-halocitosina, 7-metilguanina, 7-metiladenina, 2-F-adenina, 2-aminoadenina, 7-deazaguanina, 7-deazaadenina, 3-deazaguanina, 3-deazaadenina, 6-N-benzoiladenina, 2-N-isobutirilguanina, 4-N-benzoilcitosina, 4-N-benzoiluracilo, 5-metil 4-N-benzoilcitosina, 5-metil 4-N-benzoiluracilo, bases universales, bases hidrofóbicas, bases promiscuas, bases de tamaño expandido y bases fluoradas. Otras nucleobases modificadas son las pirimidinas tricíclicas, como la 1,3-diazafenoxazina-2-ona, la 1,3-diazafenotiazina-2-ona y la 9-(2-aminoetoxi)-1,3-diazafenoxazina-2-ona (G-clamp). Las nucleobases modificadas también pueden incluir aquellas en las que la base de purina o pirimidina se sustituye por otros heterociclos, por ejemplo 7-deaza-adenina, 7-deazaguanosina, 2-aminopiridina y 2-piridona. Otras nucleobases son las descritas en Merigan et al. 3.687.808, los divulgados en *The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., *Angewandte Chemie, International Edition*, 1991, 30, 613; Sanghvi, Y.S., Capítulo 15, *Antisense Research and Applications*, Crooke, S.T. y Lebleu, B., Eds., CRC Press, 1993, 273-288; y los divulgados en los Capítulos 6 y 15, *Antisense Drug Technology*, Crooke S.T., Ed., CRC Press, 2008, 163-166 y 442-443.

60

65

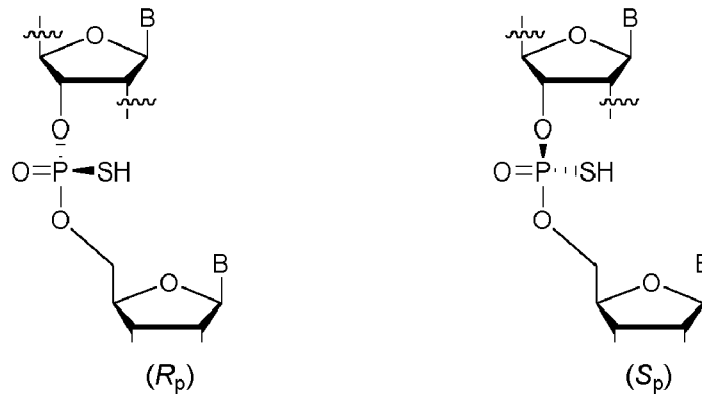
[0102] Las publicaciones que enseñan la preparación de algunas de las nucleobases modificadas mencionadas anteriormente, así como de otras nucleobases modificadas, incluyen, entre otras, Manohara et al., US2003/0158403; Manoharan et al., US2003/0175906; Dinh et al., U.S. 4,845,205; Spielvogel et al., U.S. 5,130,302; Rogers et al., U.S. 5,134,066; Bischofberger et al., U.S. 5,175,273; Urdea et al., U.S. 5,367,066; Benner et al., U.S. 5,432,272; Matteucci et al., U.S. 5,434,257; Gmeiner et al., U.S. 5,457,187; Cook et al., U.S. 5,459,255; Froehler et al., U.S. 5,484,908; Matteucci et al., U.S. 5,502,177; Hawkins et al., U.S. 5,525,711; Haralambidis et al., U.S. 5,552,540; Cook et al., U.S. 5,587,469; Froehler et al., U.S. 5,594,121; Switzer et al., U.S. 5,596,091; Cook et al., U.S. 5,614,617; Froehler et al., U.S. 5,645,985; Cook et al., U.S. 5,681,941; Cook et al., U.S. 5,811,534; Cook et al., U.S. 5,750,692; Cook et al., U.S. 5,948,903; Cook et al., U.S. 5,587,470; Cook et al., U.S. 5,457,191; Matteucci et al., U.S. 5,763,588; Froehler et al., U.S. 5,830,653; Cook et al., U.S. 5.808.027; Cook et al., 6.166.199; y Matteucci et al., U.S. 6,005,096.

3. Ciertos Enlaces Internucleósidos Modificados

[0103] Los nucleósidos de los oligonucleótidos modificados pueden unirse entre sí utilizando cualquier enlace internucleósido. Las dos clases principales de grupos de enlace internucleósido se definen por la presencia o ausencia de un átomo de fósforo. Los enlaces internucleósidos representativos que contienen fósforo incluyen, entre otros, los fosfodiésteres, que contienen un enlace fosfodiéster ("P(O₂)=O") (también denominados enlaces no modificados o naturales), fosfotriesteres, metilfosfonatos, fosforamidatos, fosforotioatos ("P(O₂)=S") y fosforoditioatos ("HS-P=S"). Los grupos enlazantes internucleósidos representativos que no contienen fósforo incluyen, entre otros, el metilmetilimino (-CH₂-N(CH₃)-O-CH₂-), el tiodiéster, el tionocarbamato (-O-C(=O)(NH)-S-); el siloxano (-O-SiH₂-O-); y la N,N'-dimetilhidrazina (-CH₃-N(CH₃)-N(CH₃)-). Los enlaces internucleósidos modificados, en comparación con los enlaces internucleósidos fosfodiésteres naturales, pueden utilizarse para alterar, normalmente aumentar, la resistencia a las nucleasas del oligonucleótido. Los enlaces internucleósidos que tienen un átomo quiral pueden prepararse como una mezcla racémica o como enantiómeros separados. Los métodos de preparación de enlaces internucleósidos que contienen fósforo y que no contienen fósforo son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0104] Los enlaces internucleósidos representativos que tienen un centro quiral incluyen, entre otros, alquilfosfonatos y fosforotioatos. Los oligonucleótidos modificados que comprenden enlaces internucleósidos que tienen un centro quiral pueden prepararse como poblaciones de oligonucleótidos modificados que comprenden enlaces internucleósidos estereorándomicos, o como poblaciones de oligonucleótidos modificados que comprenden enlaces internucleósidos fosforotioato en configuraciones estereoquímicas particulares. En ciertas realizaciones, las poblaciones de oligonucleótidos modificados comprenden enlaces internucleósidos de fosforotioato en los que todos los enlaces internucleósidos de fosforotioato son estereorándomicos. Tales oligonucleótidos modificados pueden generarse utilizando métodos sintéticos que dan lugar a una selección aleatoria de la configuración estereoquímica de cada enlace internucleósido fosforotioato. No obstante, como es bien sabido por los expertos en la materia, cada fosforotioato individual de cada molécula de oligonucleótido individual tiene una estereoconfiguración definida.

[0105] Se dan a conocer poblaciones de oligonucleótidos modificados que están enriquecidas para oligonucleótidos modificados que comprenden uno o más enlaces internucleósidos fosforotioato particulares en una configuración estereoquímica particular seleccionada independientemente. La configuración particular del enlace fosforotioato internucleósido particular puede estar presente en al menos el 65% de las moléculas de la población. La configuración particular del enlace fosforotioato internucleósido particular puede estar presente en al menos el 70% de las moléculas de la población. La configuración particular del enlace fosforotioato internucleósido particular puede estar presente en al menos el 80% de las moléculas de la población. La configuración particular del enlace fosforotioato internucleósido particular puede estar presente en al menos el 90% de las moléculas de la población. La configuración particular del enlace fosforotioato internucleósido particular puede estar presente en al menos el 99% de las moléculas de la población. Tales poblaciones quiralmemente enriquecidas de oligonucleótidos modificados pueden generarse utilizando métodos sintéticos conocidos en la técnica, por ejemplo, los métodos descritos en Oka et al., JACS 125, 8307 (2003), Wan et al. Nuc. Acid. Res. 42, 13456 (2014), y WO 2017/015555. Una población de oligonucleótidos modificados puede estar enriquecida para oligonucleótidos modificados que tengan al menos un fosforotioato indicado en la configuración (Sp). Una población de oligonucleótidos modificados puede estar enriquecida para oligonucleótidos modificados que tengan al menos un fosforotioato en la configuración (Rp). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados que comprenden (Rp) y/o (Sp) fosforotioatos comprenden una o más de las siguientes fórmulas, respectivamente, donde "B" indica una nucleobase:



[0106] A menos que se indique lo contrario, los enlaces internucleósidos quirales de los oligonucleótidos modificados aquí descritos pueden ser estereorándomicos o estar en una configuración estereoquímica particular.

[0107] Los enlaces internucleósidos neutros incluyen, sin limitación, fosfortriesteres, metilfosfonatos, MMI (3'-CH₂-N(CH₃)-O-5'), amida-3 (3'-CH₂-C(=O)-N(H)-5'), amida-4 (3'-CH₂-N(H)-C(=O)-5'), formacetal (3'-O-CH₂-O-5') y tioformacetal (3'-S-CH₂-O-5'). Otros enlaces neutros internucleósidos incluyen enlaces no iónicos que comprenden siloxano (dialquilsiloxano), éster de carboxilato, carboxamida, sulfuro, éster de sulfonato y amidas (véase, por ejemplo, *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*; Y.S.).

[0108] Sanghvi and P.D. Cook, Eds., ACS Symposium Series 580; Capítulos 3 y 4, 40-65). Otros enlaces neutros internucleósidos incluyen enlaces no iónicos que comprenden componentes mixtos N, O, S y CH₂.

B. Ciertos Motivos

[0109] Los oligonucleótidos modificados de la invención comprenden nucleósidos modificados que comprenden una fracción de azúcar modificada, como se define en las reivindicaciones. Los oligonucleótidos modificados de la invención pueden comprender nucleósidos modificados que comprenden una nucleobase modificada, como se define en las reivindicaciones. Los oligonucleótidos modificados de la invención comprenden enlaces internucleósidos modificados, tal como se definen en las reivindicaciones. Las fracciones de azúcar, nucleobases y/o enlaces internucleósidos modificados, no modificados o modificados de forma diferente de un oligonucleótido modificado definen un patrón o motivo. Los patrones de azúcares, nucleobases y enlaces internucleósidos pueden ser independientes entre sí. Así, un oligonucleótido modificado puede describirse por su motivo de azúcar, motivo de nucleobase y/o motivo de enlace internucleósido (tal como se utiliza aquí, el motivo de nucleobase describe las modificaciones de las nucleobases independientemente de la secuencia de nucleobases).

1. Ciertos Motivos de Azúcar

[0110] Los oligonucleótidos de la invención comprenden tipos de azúcar modificado y/o fracción de azúcar no modificado dispuestos a lo largo del oligonucleótido o porción del mismo en un patrón definido o motivo de azúcar, como se define en las reivindicaciones.

[0111] Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo *gapmer*, que se define por dos regiones externas o "alas" y una región central o interna o "espacio". Las tres regiones de un motivo *gapmer* (el ala 5', el espacio y el ala 3') forman una secuencia contigua de nucleósidos en la que al menos algunas de las fracciones de azúcar de los nucleósidos de cada una de las alas difieren de al menos algunas de las fracciones de azúcar de los nucleósidos del espacio. En concreto, al menos las fracciones de azúcar de los nucleósidos de cada ala que están más cerca del espacio (el nucleósido más 3' del ala 5'- y el nucleósido más 5' del ala 3'-) difieren de la fracción de azúcar de los nucleósidos vecinos del espacio, definiendo así el límite entre las alas y el espacio (es decir, la unión ala/espacio). Las fracciones de azúcar dentro del espacio pueden ser iguales entre sí. El espacio puede incluir uno o más nucleósidos que tengan una fracción de azúcar que difiera de la fracción de azúcar de uno o más nucleósidos del espacio. Los motivos de azúcar de las dos alas pueden ser iguales entre sí (*gapmer* simétrico). El motivo de azúcar del ala 5' puede diferir del motivo de azúcar del ala 3' (*gapmer* asimétrico).

las alas de un *gapmer* pueden comprender de 1 a 6 nucleósidos. Cada nucleósido de cada ala de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar modificada. Al menos un nucleósido de cada ala de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar modificada. Al menos dos nucleósidos de cada ala de un *gapmer* pueden comprender una fracción de azúcar modificada. Al menos tres nucleósidos de cada ala de un *gapmer* pueden comprender una fracción de azúcar modificada. Al menos cuatro nucleósidos de cada ala de un *gapmer* pueden comprender una fracción de azúcar modificada. Al menos cinco nucleósidos de cada ala de un *gapmer* pueden comprender una fracción de azúcar

modificada.

el espacio de un *gapmer* puede comprender de 7 a 12 nucleósidos. Al menos seis nucleósidos del espacio de un *gapmer* pueden comprender una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil. Cada nucleósido del espacio de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar 2'-desoxirribosil. Cada nucleósido del espacio de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil. Al menos un nucleósido del espacio de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar modificada. Al menos un nucleósido del espacio de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar 2'-OMe.

[0112] El *gapmer* puede ser un *gapmer* deoxi. Los nucleósidos en el lado del espacio de cada unión ala/espacio pueden comprender fracciones de azúcar 2'-desoxirribosil y los nucleósidos en los lados de las alas de cada unión ala/espacio pueden comprender fracciones de azúcar modificada. Al menos seis nucleósidos del espacio de un *gapmer* pueden comprender una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil. Cada nucleósido del espacio puede comprender una fracción de azúcar 2'-desoxirribosil. Cada nucleósido de cada ala de un *gapmer* puede comprender una fracción de azúcar modificada. Un nucleósido del espacio puede comprender una fracción de azúcar modificada y cada nucleósido restante del espacio puede comprender una fracción de azúcar 2'-desoxirribosil.

[0113] Los oligonucleótidos modificados pueden comprender o consistir en una porción que tenga un motivo de azúcar totalmente modificado. Cada nucleósido de la porción totalmente modificada del oligonucleótido modificado puede comprender una fracción de azúcar modificada. Cada nucleósido del oligonucleótido modificado completo puede comprender una fracción de azúcar modificada. Los oligonucleótidos modificados pueden comprender o consistir en una porción que tiene un motivo de azúcar totalmente modificado, en el que cada nucleósido dentro de la porción totalmente modificada comprende la misma fracción de azúcar modificada, denominada en el presente documento motivo de azúcar uniformemente modificado. Un oligonucleótido totalmente modificado puede ser un oligonucleótido uniformemente modificado. Cada nucleósido de un oligonucleótido modificado uniformemente puede comprender la misma modificación en 2'.

[0114] En este caso, las longitudes (número de nucleósidos) de las tres regiones de un *gapmer* pueden proporcionarse utilizando la notación [# de nucleósidos en el ala 5'-] - [# de nucleósidos en el espacio] - [# de nucleósidos en el ala 3'-]. Así, un *gapmer* 5-10-5 consta de 5 nucleósidos enlazados en cada ala y 10 nucleósidos enlazados en el espacio. Cuando dicha nomenclatura va seguida de una modificación específica, dicha modificación es la modificación en cada fracción de azúcar de cada ala y los nucleósidos espacio comprenden una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil. Así, un *gapmer* 5-10-5 MOE consta de 5 nucleósidos 2'-MOE enlazados en el ala 5'-, 10 β-D-desoxinucleósidos enlazados en el espacio, y 5 nucleósidos 2'-MOE enlazados en el ala 3'-. Un *gapmer* 3-10-3 cEt consta de 3 nucleósidos cEt enlazados en el ala 5', 10 β-D-desoxinucleósidos enlazados en el espacio y 3 nucleósidos cEt enlazados en el ala 3'. Un *gapmer* 5-8-5 consiste en 5 nucleósidos enlazados que comprenden una fracción de azúcar modificada en el ala 5', 8 2'-desoxinucleósidos enlazados en el espacio y 5 nucleósidos enlazados que comprenden una fracción de azúcar modificada en el ala 3'. Un *gapmer* de ala mixta tiene al menos dos azúcares modificados diferentes en el ala 5' y/o 3'. Un *gapmer* de alas mixtas 5-8-5 o 5-8-4 tiene al menos dos fracciones de azúcar modificado diferentes en las alas 5'- y/o 3'-.

[0115] Los oligonucleótidos modificados pueden ser *gapmers* 5-10-5 MOE. Los oligonucleótidos modificados pueden ser *gapmers* 4-10-6 MOE. Los oligonucleótidos modificados pueden ser *gapmers* 6-10-4 MOE. Los oligonucleótidos modificados pueden ser *gapmers* 5-8-5 MOE. Los oligonucleótidos modificados pueden ser *gapmers* X-Y-Z MOE, en los que X y Z se seleccionan independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleósidos 2'-MOE enlazados e Y son desoxinucleósidos 7, 8, 9, 10 u 11 enlazados.

[0116] Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de azúcar seleccionado entre los siguientes (5' a 3'): meeemdddddddddmmmmmm, donde 'd' representa una fracción de azúcar 2'-desoxirribosil, 'e' representa una fracción de azúcar 2'-MOE, y 'm' representa una fracción de azúcar 2'-OMe.

2. Ciertos Motivos Nucleobásicos

[0117] Los oligonucleótidos de la invención comprenden nucleobases modificadas y/o no modificadas dispuestas a lo largo del oligonucleótido o porción del mismo en un patrón o motivo definido, como se define en las reivindicaciones. En un oligonucleótido modificado de la divulgación, cada nucleobase puede estar modificada. Ninguna de las nucleobases puede ser modificada. Cada purina o cada pirimidina puede ser modificada. Cada adenina puede ser modificada. Cada guanina puede ser modificada. Cada timina puede ser modificada. Cada uracilo puede ser modificado. Cada citosina puede ser modificada. Algunas o todas las nucleobases de citosina en un oligonucleótido modificado pueden ser 5-metil citosinas. Todas las nucleobases de citosina pueden ser 5-metil citosinas y todas las demás nucleobases del oligonucleótido modificado pueden ser nucleobases no modificadas.

[0118] Los oligonucleótidos modificados pueden comprender un bloque de nucleobases modificadas. El bloque puede estar en el extremo 3' del oligonucleótido. El bloque puede estar dentro de los 3 nucleósidos del extremo 3' del oligonucleótido. El bloque puede estar en el extremo 5' del oligonucleótido. El bloque puede estar dentro de los 3 nucleósidos del extremo 5' del oligonucleótido.

[0119] Los oligonucleótidos que tienen un motivo *gapmer* pueden comprender un nucleósido que comprende una nucleobase modificada. Un nucleósido que comprende una nucleobase modificada puede estar en el espacio central de un oligonucleótido que tenga un motivo *gapmer*. La fracción de azúcar del nucleósido puede ser una fracción de azúcar 2'-desoxirribosil. La nucleobase modificada puede seleccionarse entre: una 2-tiopirimidina y una 5-propinepirimidina.

5 **3. Ciertos Motivos de Enlace Internucleósido**

[0120] Los oligonucleótidos de la invención comprenden enlaces internucleósidos modificados y/o no modificados dispuestos a lo largo del oligonucleótido o porción del mismo en un patrón o motivo definido, como se define en las reivindicaciones.

[0121] Un grupo de enlace internucleósido puede ser un enlace fosfodiéster internucleósido ($P(O_2)=O$). Un grupo de enlace internucleósido de un oligonucleótido modificado puede ser un enlace internucleósido fosforotioato ($P(O_2)=S$). Cada enlace internucleósido de un oligonucleótido modificado se selecciona independientemente entre un enlace internucleósido fosforotioato y un enlace internucleósido fosfodiéster. Cada enlace internucleósido fosforotioato puede seleccionarse independientemente entre un fosforotioato estereorándomico, un fosforotioato (*Sp*) y un fosforotioato (*Rp*). El motivo de azúcar de un oligonucleótido modificado de la divulgación puede ser un *gapmer* y los enlaces internucleósidos dentro del espacio pueden estar todos modificados. Algunos o todos los enlaces internucleósidos de las alas pueden ser enlaces internucleósidos fosfodiéster no modificados. Los enlaces internucleósidos terminales pueden modificarse. El motivo de azúcar de un oligonucleótido modificado puede ser un *gapmer*, y el motivo de enlace internucleósido puede comprender al menos un enlace internucleósido fosfodiéster en al menos un ala, en el que el al menos un enlace internucleósido fosfodiéster no es un enlace internucleósido terminal, y los enlaces internucleósidos restantes son enlaces internucleósidos fosforotioato. Todos los enlaces fosforotioato internucleósido pueden ser estereorándomicos. Todos los enlaces internucleósidos fosforotioato en las alas pueden ser fosforotioatos (*Sp*), y el espacio puede comprender al menos un motivo *Sp*, *Sp*, *Rp*. Las poblaciones de oligonucleótidos modificados pueden estar enriquecidas para oligonucleótidos modificados que comprenden tales motivos de enlace internucleósido.

[0122] Todos los enlaces internucleósidos pueden ser enlaces internucleósidos fosfodiéster o enlaces internucleósidos fosforotioato, y el motivo quiral es (5' a 3'): *Sp-o-o-o-Sp-Sp-Sp-Rp-Sp-Sp-Rp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp* or *Sp-o-o-o-Sp-Sp-Sp-Rp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp-Sp*, donde cada "Sp" representa un enlace internucleósido fosforotioato (*Sp*), cada "Rp" es un enlace internucleósido *Rp*, y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster. Las poblaciones de oligonucleótidos modificados pueden estar enriquecidas para oligonucleótidos modificados que comprenden tales motivos de enlace internucleósido.

[0123] Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de enlace internucleósido de *sooooooossssssssooss*, donde cada "s" representa un enlace internucleósido fosforotioato y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster. Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de enlace internucleósido de (5' a 3'): *sooooooossssssssooss*, donde cada "s" representa un enlace internucleósido fosforotioato y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster. Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de enlace internucleósido de (5' a 3'): *sooooooossssssssooss*, donde cada "s" representa un enlace internucleósido fosforotioato y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster. Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de enlace internucleósido de (5' a 3'): *sooooooossssssssooss*, donde cada "s" representa un enlace internucleósido fosforotioato y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster. Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de enlace internucleósido de (5' a 3'): *sooooooossssssssooss*, donde cada "s" representa un enlace internucleósido fosforotioato y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster. Los oligonucleótidos modificados pueden tener un motivo de enlace internucleósido de (5' a 3'): *sooooooossssssssooss*, donde cada "s" representa un enlace internucleósido fosforotioato y cada "o" representa un enlace internucleósido fosfodiéster.

50 **C. Ciertas Longitudes**

[0124] Es posible aumentar o disminuir la longitud de un oligonucleótido sin eliminar la actividad. Por ejemplo, en Woolf et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7305-7309, 1992) se probó la capacidad de una serie de oligonucleótidos de 13-25 nucleobases de longitud para inducir la escisión de un ácido nucleico diana en un modelo de inyección en ovocitos. Los oligonucleótidos de 25 nucleobases de longitud con 8 u 11 bases desajustadas cerca de los extremos de los oligonucleótidos fueron capaces de dirigir la escisión específica del ácido nucleico diana, aunque en menor medida que los oligonucleótidos que no contenían desajustes. Del mismo modo, se logró la escisión específica de la diana utilizando oligonucleótidos de 13 nucleobases, incluidos aquellos con 1 o 3 desajustes.

[0125] Los oligonucleótidos (incluyendo oligonucleótidos modificados) pueden tener cualquiera de una variedad de intervalos de longitudes. Los oligonucleótidos pueden consistir en nucleósidos enlazados de X a Y, donde X representa el menor número de nucleósidos en el intervalo e Y representa el mayor número de nucleósidos en el intervalo. X e Y pueden seleccionarse cada uno independientemente entre 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 y 50; siempre que $X \leq Y$. Por ejemplo, los oligonucleótidos pueden consistir en 12 a 13, 12 a 14, 12 a 15, 12 a 16, 12 a 17, 12 a 18, 12 a 19, 12 a 20, 12 a 21, 12 a 22, 12 a 23, 12 a 24, 12 a 25, 12 a 26, 12 a 27, 12 a 28, 12 a 29, 12 a 30, 13 a 14, 13 a 15, 13 a 16, 13 a 17, 13 a 18, 13 a 19, 13 a 20, 13 a 21, 13 a 22, 13 a 23, 13 a 24, 13 a 25, 13 a 26, 13 a 27, 13 a 28, 13 a 29, 13 a 30, 14

a 15, 14 a 16, 14 a 17, 14 a 18, 14 a 19, 14 a 20, 14 a 21, 14 a 22, 14 a 23, 14 a 24, 14 a 25, 14 a 26, 14 a 27, 14 a 28, 14 a 29, 14 a 30, 15 a 16, 15 a 17, 15 a 18, 15 a 19, 15 a 20, 15 a 21, 15 a 22, 15 a 23, 15 a 24, 15 a 25, 15 a 26, 15 a 27, 15 a 28, 15 a 29, 15 a 30, 16 a 17, 16 a 18, 16 a 19, 16 a 20, 16 a 21, 16 a 22, 16 a 23, 16 a 24, 16 a 25, 16 a 26, 16 a 27, 16 a 28, 16 a 29, 16 a 30, 17 a 18, 17 a 19, 17 a 20, 17 a 21, 17 a 22, 17 a 23, 17 a 24, 17 a 25, 17 a 26, 17 a 27, 17 a 28, 17 a 29, 17 a 30, 18 a 19, 18 a 20, 18 a 21, 18 a 22, 18 a 23, 18 a 24, 18 a 25, 18 a 26, 18 a 27, 18 a 28, 18 a 29, 18 a 30, 19 a 20, 19 a 21, 19 a 22, 19 a 23, 19 a 24, 19 a 25, 19 a 26, 19 a 29, 19 a 28, 19 a 29, 19 a 30, 20 a 21, 20 a 22, 20 a 23, 20 a 24, 20 a 25, 20 a 26, 20 a 27, 20 a 28, 20 a 29, 20 a 30, 21 a 22, 21 a 23, 21 a 24, 21 a 25, 21 a 26, 21 a 27, 21 a 28, 21 a 29, 21 a 30, 22 a 23, 22 a 24, 22 a 25, 22 a 26, 22 a 27, 22 a 28, 22 a 29, 22 a 30, 23 a 24, 23 a 25, 23 a 26, 23 a 27, 23 a 28, 23 a 29, 23 a 30, 24 a 25, 24 a 26, 24 a 27, 24 a 28, 24 a 29, 24 a 30, 25 a 26, 25 a 27, 25 a 28, 25 a 29, 25 a 30, 26 a 27, 26 a 28, 26 a 29, 26 a 30, 27 a 28, 27 a 29, 27 a 30, 28 a 29, 28 a 30 o 29 a 30 nucleósidos enlazados.

D. Ciertos Oligonucleótidos Modificados

[0126] Las modificaciones anteriores (azúcar, nucleobase, enlace internucleósido) se incorporan a los oligonucleótidos modificados de la invención, tal como se definen en las reivindicaciones. Los oligonucleótidos modificados pueden caracterizarse por sus motivos de modificación y longitudes totales. Dichos parámetros pueden ser independientes entre sí. Así, a menos que se indique lo contrario, cada enlace internucleósido de un oligonucleótido que tenga un motivo de azúcar *gapmer* puede estar modificado o sin modificar y puede seguir o no el patrón de modificación *gapmer* de las modificaciones de azúcar. Por ejemplo, los enlaces internucleósidos dentro de las regiones alares de un *gapmer* de azúcar pueden ser iguales o diferentes entre sí y pueden ser iguales o diferentes de los enlaces internucleósidos de la región espacio del motivo de azúcar. Asimismo, dichos oligonucleótidos *gapmer* de azúcar pueden comprender una o más nucleobases modificadas independientes del patrón *gapmer* de las modificaciones de azúcar. A menos que se indique lo contrario, todas las modificaciones son independientes de la secuencia de nucleobases.

E. Ciertas Poblaciones de Oligonucleótidos Modificados

[0127] Las poblaciones de oligonucleótidos modificados en las que todos los oligonucleótidos modificados de la población tienen la misma fórmula molecular pueden ser poblaciones estereorándomicas o poblaciones enriquecidas quiralmente. Todos los centros quirales de todos los oligonucleótidos modificados son estereorándomicos en una población estereorándomica. En una población quiralmente enriquecida, al menos un centro quiral particular no es estereorandomérico en los oligonucleótidos modificados de la población. Los oligonucleótidos modificados de una población enriquecida quiralmente pueden estar enriquecidos para restos de azúcares β -D ribosil, y todos los enlaces internucleósidos fosforotioato pueden ser estereorándomicos. Los oligonucleótidos modificados de una población enriquecida quiralmente pueden estar enriquecidos tanto para restos de azúcar β -D ribosil como para al menos un enlace internucleósido fosforotioato particular en una configuración estereoquímica particular.

F. Secuencia de Nucleobases

[0128] Los oligonucleótidos (oligonucleótidos no modificados o modificados) pueden describirse además por su secuencia de nucleobases. Los oligonucleótidos pueden tener una secuencia de nucleobases complementaria a un segundo oligonucleótido o a un ácido nucleico de referencia identificado, como un ácido nucleico diana. Una porción de un oligonucleótido puede tener una secuencia de nucleobases complementaria a un segundo oligonucleótido o a un ácido nucleico de referencia identificado, como un ácido nucleico diana. La secuencia de nucleobases de una porción o de toda la longitud de un oligonucleótido puede ser al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100% complementaria al segundo oligonucleótido o ácido nucleico, tal como un ácido nucleico diana.

II. Ciertos Compuestos Oligoméricos

[0129] Se proporcionan aquí compuestos oligoméricos, que consisten en un oligonucleótido modificado y opcionalmente uno o más grupos conjugados y/o grupos terminales, como se define en las reivindicaciones. Los grupos conjugados consisten en una o más fracciones conjugadas y un enlazador conjugado que une la fracción conjugada al oligonucleótido. Los grupos conjugados pueden unirse a uno o ambos extremos de un oligonucleótido y/o en cualquier posición interna. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se unen a la posición 2' de un nucleósido de un oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados que se unen a uno o ambos extremos de un oligonucleótido son grupos terminales. En ciertas realizaciones, se unen grupos conjugados o grupos terminales en los extremos 3' y/o 5' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados (o grupos terminales) se unen al extremo 3' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se unen cerca del extremo 3' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados (o grupos terminales) se unen al extremo 5' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se unen cerca del extremo 5' de los oligonucleótidos.

[0130] Ejemplos de grupos terminales incluyen, pero no se limitan a, grupos conjugados, grupos de remate, fracciones de fosfato, grupos protectores, nucleósidos abásicos, nucleósidos modificados o no modificados, y dos o más nucleósidos independientemente modificados o no modificados.

A. Ciertos Grupos Conjugados

[0131] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos están unidos covalentemente a uno o más grupos conjugados. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del oligonucleótido unido, incluyendo pero sin limitarse a la farmacodinámica, farmacocinética, estabilidad, unión, absorción, distribución tisular, distribución celular, captación celular, carga y aclaramiento. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados confieren una nueva propiedad al oligonucleótido unido, *por ejemplo*, fluoróforos o grupos informadores que permiten la detección del oligonucleótido. Ciertos grupos conjugados y fracciones conjugadas se han descrito anteriormente, por ejemplo: fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, *p. ej.*, hexil-S-tritilol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, *p. ej.*, do-decan-diol o residuos de undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicerol-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético una fracción de palmito (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937), un grupo tocoferol (Nishina et al., Molecular Therapy Nucleic Acids, 2015, 4, e220; y Nishina et al., Molecular Therapy, 2008, 16, 734-740), o un grupo GalNAc (*p. ej.*, documento WO2014/179620).

1. Fracciones Conjugadas

[0132] Las fracciones conjugadas incluyen, sin limitación, intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, péptidos, carbohidratos (*p. ej.*, GalNAc), fracciones vitamínicas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesterolos, tiocolesterolos, fracciones de ácido cólico, folato, lípidos, grupos lipofílicos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, fluoróforos y colorantes.

[0133] En ciertas realizaciones, una fracción conjugada comprende un principio activo, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fen-bufen, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilarsosina, ácido 2-,3,5-triidobenzoico, fingolimod, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, una clorotiazida, una diazepina, una indo-meticina, un barbitúrico, una cefalosporina, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

2. Enlazadores Conjugados

[0134] Las fracciones conjugadas se unen a los oligonucleótidos mediante enlazadores conjugados. En ciertos compuestos oligoméricos, el enlazador conjugado es un enlace químico simple (es decir, la fracción conjugada está unida directamente a un oligonucleótido mediante un enlace simple). En ciertos compuestos oligoméricos, una fracción conjugada se une a un oligonucleótido a través de un enlazador conjugado más complejo que comprende una o más fracciones de enlazador conjugado, que son subunidades que forman un enlazador conjugado. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende una estructura de cadena, como una cadena de hidrocarbilo, o un oligómero de unidades repetitivas como etilenglicol, nucleósidos o unidades de aminoácidos.

[0135] En ciertas realizaciones, un enlazador conjugado comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxilamino. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida y éter. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende grupos seleccionados entre grupos alquilo y amida. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende grupos seleccionados entre grupos alquilo y éter. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende al menos una fracción de fósforo. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende al menos un grupo fosfato. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado incluye al menos un grupo enlazador neutro.

[0136] En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados, incluyendo los enlazadores conjugados descritos anteriormente, son elementos de enlace bifuncionales, *p. ej.*, aquellos conocidos en la técnica por ser útiles para unir grupos conjugados a compuestos parentales, tales como los oligonucleótidos proporcionados en el presente documento. En general, una fracción de enlace bifuncional comprende al menos dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unirse a un sitio concreto de un compuesto original y el otro se selecciona para unirse a un grupo conjugado. Los ejemplos de grupos funcionales utilizados en una fracción de enlace bifuncional incluyen, entre otros, electrófilos para reaccionar con grupos nucleófilos y nucleófilos para reaccionar con grupos electrófilos. En ciertas realizaciones, las fracciones de enlace bifuncionales comprenden uno o más grupos seleccionados entre amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, alquilo, alqueno y alquino.

[0137] Ejemplos de enlazadores conjugados incluyen pero no se limitan a pirrolidina, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHEx o AHA). Otros enlazadores conjugados incluyen pero no se limitan a alquilo C_i-C_{io} sustituido o no sustituido, alqueno C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido o alquino C₂-C₁₀ sustituido o no sustituido, donde una lista no limitativa de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alqueno y

alquinilo.

5 [0138] En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden 1-10 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden 2-5 enlazadores-nucleósidos. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden exactamente 3 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden el motivo TCA. En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos enlazadores son nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos enlazadores comprenden una fracción de azúcar modificada. En ciertas realizaciones, los nucleósidos enlazadores no están modificados. En ciertas realizaciones, los nucleósidos enlazadores comprenden una base heterocíclica opcionalmente protegida seleccionada entre una purina, una purina sustituida, una pirimidina o una pirimidina sustituida. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un nucleósido seleccionado entre uracilo, timina, citosina, 4-N-benzoilcitosina, 5-metilcitosina, 4-N-benzoil-5-metilcitosina, adenina, 6-N-benzoiladenina, guanina y 2-N-isobutirilguanina. Por lo general, es deseable que los nucleósidos enlazadores se separen del compuesto oligomérico después de llegar al tejido diana. En consecuencia, los nucleósidos enlazadores suelen estar unidos entre sí y al resto del compuesto oligomérico mediante enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, dichos enlaces escindibles son enlaces fosfodiéster.

20 [0139] En este caso, los nucleósidos enlazadores no se consideran parte del oligonucleótido. Por consiguiente, en las realizaciones en las que un compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido que consiste en un número o intervalo especificado de nucleósidos enlazados y/o un porcentaje especificado de complementariedad con un ácido nucleico de referencia y el compuesto oligomérico también comprende un grupo conjugado que comprende un enlazador conjugado que comprende nucleósidos enlazadores, esos nucleósidos enlazadores no se cuentan para la longitud del oligonucleótido y no se usan para determinar el porcentaje de complementariedad del oligonucleótido con el ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, un compuesto oligomérico puede comprender (1) un oligonucleótido modificado formado por 8-30 nucleósidos y (2) un grupo conjugado formado por 1-10 nucleósidos enlazadores contiguos a los nucleósidos del oligonucleótido modificado. El número total de nucleósidos enlazados contiguos en dicho compuesto oligomérico es superior a 30. Alternativamente, un compuesto oligomérico puede comprender un oligonucleótido modificado formado por 8-30 nucleósidos y sin grupo conjugado. El número total de nucleósidos enlazados contiguos en dicho compuesto oligomérico no es superior a 30. A menos que se indique lo contrario, los enlazadores conjugados no comprenden más de 10 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 5 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 3 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 2 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 1 enlazador-nucleósido.

35 [0140] En ciertas realizaciones, es deseable que un grupo conjugado sea escindido del oligonucleótido. Por ejemplo, en ciertas circunstancias los compuestos oligoméricos que comprenden una fracción conjugada particular son mejor absorbidos por un tipo celular particular, pero una vez que el compuesto oligomérico ha sido absorbido, es deseable que el grupo conjugado sea escindido para liberar el oligonucleótido no conjugado o parental. Así, ciertos enlazadores conjugados pueden comprender una o más fracciones escindibles. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un enlace escindible. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un grupo de átomos que comprende al menos un enlace escindible. En ciertas realizaciones, una fracción escindible comprende un grupo de átomos que tienen uno, dos, tres, cuatro o más de cuatro enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, una fracción escindible se escinde selectivamente dentro de una célula o compartimento subcelular, como un lisosoma. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es escindida selectivamente por enzimas endógenas, tales como nucleasas.

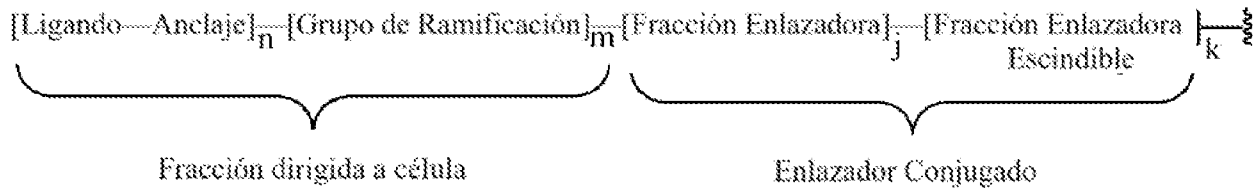
45 [0141] En ciertas realizaciones, un enlace escindible se selecciona entre: una amida, un éster, un éter, uno o ambos ésteres de un fosfodiéster, un éster de fosfato, un carbamato o un disulfuro. En ciertas realizaciones, un enlace escindible es uno o ambos de los ésteres de un fosfodiéster. En ciertas realizaciones, una fracción escindible comprende un fosfato o fosfodiéster. En ciertas realizaciones, la fracción escindible es un enlace fosfato o fosfodiéster entre un oligonucleótido y una fracción conjugada o grupo conjugado.

50 [0142] En ciertas realizaciones, una fracción escindible comprende o consiste en uno o más nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos enlazadores están unidos entre sí y/o al resto del compuesto oligomérico mediante enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, dichos enlaces escindibles son enlaces fosfodiéster no modificados. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un 2'-desoxinucleósido que está unido al nucleósido 3' o 5'-terminal de un oligonucleótido mediante un enlace fosfodiéster internucleósido y unido covalentemente al resto del enlazador conjugado o fracción conjugada mediante un enlace fosfato o fosforotioato internucleósido. En ciertas realizaciones, la fracción escindible es 2'-desoxiadenosina.

3. Fracciones Dirigidas a Células

60 [0143] En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende una fracción dirigida a células. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado tiene la fórmula general:

65



donde n es de 1 a aproximadamente 3, m es 0 cuando n es 1, m es 1 cuando n es 2 o mayor, j es 1 o 0, y k es 1 o 0.

[0144] En ciertas realizaciones, n es 1, j es 1 y k es 0. En ciertas realizaciones, n es 1, j es 0 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 1, j es 1 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 2, j es 1 y k es 0. En ciertas realizaciones, n es 2, j es 0 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 2, j es 1 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 3, j es 1 y k es 0. En ciertas realizaciones, n es 3, j es 0 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 3, j es 1 y k es 1.

[0145] En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden fracciones dirigidas a células que tienen al menos un ligando ligado. En ciertas realizaciones, las fracciones dirigidas a las células comprenden dos ligandos unidos covalentemente a un grupo ramificado. En ciertas realizaciones, las fracciones dirigidas a las células comprenden tres ligandos unidos covalentemente a un grupo ramificado.

B. Ciertos Grupos Terminales

[0146] En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden uno o más grupos terminales. En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos comprenden un 5'-fosfato estabilizado. Los 5'-fosfatos estabilizados incluyen, entre otros, los 5'-fosfonatos, incluidos, entre otros, los 5'-vinilfosfonatos. En ciertas realizaciones, los grupos terminales comprenden uno o más nucleósidos abásicos y/o nucleósidos invertidos. En ciertas realizaciones, los grupos terminales comprenden uno o más nucleósidos ligados en 2'. En ciertas realizaciones, el nucleósido ligado en 2' es un nucleósido abásico.

III. Dúplex oligoméricos

[0147] Los compuestos oligoméricos aquí descritos pueden comprender un oligonucleótido, que tiene una secuencia de nucleobases complementaria a la de un ácido nucleico diana. Un compuesto oligomérico puede emparejarse con un segundo compuesto oligomérico para formar un dúplex oligomérico. Tales dúplex oligoméricos comprenden un primer compuesto oligomérico que tiene una porción complementaria a un ácido nucleico diana y un segundo compuesto oligomérico que tiene una porción complementaria al primer compuesto oligomérico. El primer compuesto oligomérico de un dúplex oligomérico puede comprender o consistir en (1) un oligonucleótido modificado o no modificado y opcionalmente un grupo conjugado y (2) un segundo oligonucleótido modificado o no modificado y opcionalmente un grupo conjugado. Uno o ambos compuestos oligoméricos de un dúplex oligomérico pueden comprender un grupo conjugado. Los oligonucleótidos de cada compuesto oligomérico de un dúplex oligomérico pueden incluir nucleósidos salientes no complementarios.

IV. Actividad Antisentido

[0148] Los compuestos oligoméricos y los dúplex oligoméricos pueden ser capaces de hibridarse a un ácido nucleico diana, dando como resultado al menos una actividad antisentido; tales compuestos oligoméricos y dúplex oligoméricos son compuestos antisentido. Los compuestos antisentido pueden tener actividad antisentido cuando reducen la cantidad o la actividad de un ácido nucleico diana en un 25% o más en el ensayo celular estándar. Los compuestos antisentido pueden afectar selectivamente a uno o más ácidos nucleicos diana. Dichos compuestos antisentido pueden comprender una secuencia de nucleobase que se hibrida con uno o más ácidos nucleicos diana, dando lugar a una o más actividades antisentido deseadas y no se hibrida con uno o más ácidos nucleicos no diana o no se hibrida con uno o más ácidos nucleicos no diana de tal manera que dé lugar a una actividad antisentido no deseada significativa.

[0149] En ciertas actividades antisentido, la hibridación de un compuesto antisentido a un ácido nucleico diana resulta en el reclutamiento de una proteína que escinde el ácido nucleico diana. Por ejemplo, ciertos compuestos antisentido provocan la escisión del ácido nucleico diana mediada por la ARNasa H. La ARNasa H es una endonucleasa celular que escinde la cadena de ARN de un dúplex de ARN:ADN. El ADN de dicho dúplex ARN:ADN no tiene por qué ser ADN no modificado. En el presente documento se describen compuestos antisentido que son suficientemente "similares al ADN" para provocar la actividad de la ARNasa H. Pueden tolerarse uno o más nucleósidos no similares al ADN en el espacio de un *gapper*.

[0150] En ciertas actividades antisentido, un compuesto antisentido o una porción de un compuesto antisentido se carga en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), resultando finalmente en la escisión del ácido nucleico diana. Por ejemplo, ciertos compuestos antisentido provocan la escisión del ácido nucleico diana por Argonaute. Los compuestos antisentido que se cargan en el RISC son compuestos de ARNi. Los compuestos de ARNi pueden ser bicatenarios (ARNsi) o monocatenarios (ARNss).

[0151] La hibridación de un compuesto antisentido a un ácido nucleico diana puede no resultar en el reclutamiento de una proteína que escinde ese ácido nucleico diana. La hibridación del compuesto antisentido con el ácido nucleico diana puede dar lugar a la alteración del empalme del ácido nucleico diana. La hibridación de un compuesto antisentido con un ácido nucleico diana puede provocar la inhibición de una interacción de unión entre el ácido nucleico diana y una proteína u otro ácido nucleico. La hibridación de un compuesto antisentido a un ácido nucleico diana puede dar lugar a la alteración de la traducción del ácido nucleico diana.

[0152] Las actividades antisentido pueden observarse directa o indirectamente. La observación o detección de una actividad antisentido puede implicar la observación o detección de un cambio en una cantidad de un ácido nucleico diana o proteína codificada por dicho ácido nucleico diana, un cambio en la proporción de variantes de empalme de un ácido nucleico o proteína y/o un cambio fenotípico en una célula o sujeto.

V. Ciertos Ácidos Nucleicos Diana

[0153] Los compuestos oligoméricos pueden comprender o consistir en un oligonucleótido que comprende una porción que es complementaria a un ácido nucleico diana. El ácido nucleico diana puede ser una molécula de ARN endógena. El ácido nucleico diana puede codificar una proteína. El ácido nucleico diana puede seleccionarse entre: un ARNm maduro y un ARNpre-m, incluyendo regiones intrónicas, exónicas y no traducidas. El ácido nucleico diana puede ser un ARNm maduro. El ácido nucleico diana puede ser un ARNpre-m. La región diana puede estar completamente dentro de un intrón. La región diana puede abarcar una unión intrón/exón. La región diana puede estar al menos en un 50% dentro de un intrón.

A. Complementariedad/Desajustes con el Ácido Nucleico Diana

[0154] Es posible introducir bases de desajuste sin eliminar la actividad. Por ejemplo, Gautschi et al (J. Natl. Cancer Inst. 93:463-471, marzo de 2001) demostró la capacidad de un oligonucleótido con una complementariedad del 100% con el ARNm de bcl-2 y con 3 desajustes con el ARNm de bcl-xL para reducir la expresión tanto de bcl-2 como de bcl-xL *in vitro* e *in vivo*. Además, este oligonucleótido demostró una potente actividad antitumoral *in vivo*. Maher y Dolnick (Nuc. Acid. Res. 16:3341-3358, 1988) probaron una serie de oligonucleótidos en tándem de 14 nucleobases, y oligonucleótidos de 28 y 42 nucleobases compuestos por la secuencia de dos o tres de los oligonucleótidos en tándem, respectivamente, para determinar su capacidad de detener la traducción de la DHFR humana en un ensayo con eritrocitos de conejo. Cada uno de los tres oligonucleótidos de 14 nucleobases por sí solo fue capaz de inhibir la traducción, aunque a un nivel más modesto que los oligonucleótidos de 28 o 42 nucleobases.

[0155] Los oligonucleótidos pueden ser complementarios al ácido nucleico diana en toda la longitud del oligonucleótido. Los oligonucleótidos pueden ser complementarios al ácido nucleico diana en un 99%, 95%, 90%, 85% u 80%. Los oligonucleótidos pueden ser al menos un 80% complementarios al ácido nucleico diana en toda la longitud del oligonucleótido y pueden comprender una porción que sea 100% o totalmente complementaria a un ácido nucleico diana. La porción de complementariedad completa puede tener 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleobases de longitud.

[0156] Los oligonucleótidos pueden comprender una o más nucleobases mal emparejadas en relación con el ácido nucleico diana. La actividad antisentido contra la diana puede verse reducida por dicho desajuste, pero la actividad contra una no diana se reduce en mayor medida. De este modo, puede mejorarse la selectividad del oligonucleótido. El desajuste puede situarse específicamente dentro de un oligonucleótido que tenga un motivo *gapmer*. El desajuste puede estar en la posición 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 u 11 del extremo 5' de la región de espacio. El desajuste puede estar en la posición 1, 2, 3, 4, 5 o 6 del extremo 5' de la región alar 5' o de la región alar 3'.

B. AGT

[0157] Los compuestos oligoméricos de la invención comprenden o consisten en un oligonucleótido que es complementario a un ácido nucleico diana, donde el ácido nucleico diana es un ácido nucleico AGT, como se define en las reivindicaciones. El ácido nucleico AGT puede tener la secuencia establecida en SEQ ID N.º: 1 (Adhesión GENBANK N.º NM_000029.3) o SEQ ID N.º: 2 (el complemento de Adhesión GENBANK N.º NC_000001.11 truncado de los nucleótidos 230700001 a 230718000).

[0158] Poner en contacto una célula con un compuesto oligomérico complementario de cualquiera de las SEQ ID N.º: 1 y 2 pueden reducir la cantidad de ARN de AGT y pueden reducir la cantidad de proteína AGT. El compuesto oligomérico puede consistir en un oligonucleótido modificado. Poner en contacto una célula con un compuesto oligomérico complementario a cualquiera de las SEQ ID N.º: 1 y 2 pueden reducir la cantidad de ARN AGT en una célula, y pueden reducir la cantidad de proteína AGT en una célula. La célula puede estar *in vitro*. La célula puede estar en un sujeto. El compuesto oligomérico puede consistir en un oligonucleótido modificado. Poner en contacto una célula de un sujeto con un compuesto oligomérico complementario a cualquiera de las SEQ ID N.º: 1 y 2 pueden mejorar uno o más síntomas o signos distintivos de una enfermedad cardiovascular. La enfermedad puede ser hipertensión. La enfermedad puede ser hipertensión resistente. La enfermedad puede ser el síndrome de Marfan. La enfermedad puede ser una insuficiencia

cardíaca. El síntoma o sello distintivo puede seleccionarse entre hipertensión, enfermedad renal crónica, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca, enfermedad cardíaca valvular, aneurismas de los vasos sanguíneos, enfermedad arterial periférica y daño orgánico.

5 **[0159]** Un compuesto oligomérico complementario de cualquiera de las SEQ ID N.º: 1 y 2 pueden ser capaces de reducir la cantidad detectable de ARN de AGT *in vitro* en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% cuando se administran según el ensayo celular estándar. Un compuesto oligomérico complementario de SEQ ID N.º: 1 o 2 pueden ser capaces de disminuir la cantidad de AGT *in vitro* en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90% cuando se administran según el ensayo *in vitro* estándar. Un compuesto oligomérico complementario de SEQ ID N.º: 1 o SEQ ID N.º: 2 puede ser capaz de reducir la cantidad detectable de ARN de AGT en un sujeto en al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% o al menos un 90%.

15 **VI. Ciertos Compuestos Conjugados**

[0160] Los compuestos oligoméricos aquí descritos comprenden o consisten en un oligonucleótido modificado y, opcionalmente, uno o más grupos conjugados y/o grupos terminales, como se define en las reivindicaciones. Los grupos conjugados consisten en una o más fracciones conjugadas y un enlazador conjugado que une la fracción conjugada al oligonucleótido. Los grupos conjugados pueden unirse a uno o ambos extremos de un oligonucleótido y/o en cualquier posición interna. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se unen a la posición 2' de un nucleósido de un oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados que se unen a uno o ambos extremos de un oligonucleótido son grupos terminales. En ciertas realizaciones, se unen grupos conjugados o grupos terminales en los extremos 3' y/o 5' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados (o grupos terminales) se unen al extremo 3' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se unen cerca del extremo 3' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados (o grupos terminales) se unen al extremo 5' de los oligonucleótidos. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados se unen cerca del extremo 5' de los oligonucleótidos.

30 **[0161]** El oligonucleótido de un compuesto puede tener una secuencia de nucleobases complementaria a un ácido nucleico diana. Los oligonucleótidos pueden ser complementarios a un ARN mensajero (ARNm). Los oligonucleótidos pueden ser complementarios a un ARNpre-m. Los oligonucleótidos pueden ser complementarios a un transcrito de sentido.

35 **[0162]** Los ejemplos de grupos terminales incluyen, pero no se limitan a, grupos conjugados, grupos tapón, moléculas de fosfato, grupos protectores, nucleósidos modificados o no modificados, y dos o más nucleósidos que están independientemente modificados o no modificados.

40 **[0163]** En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos están unidos covalentemente a uno o más grupos conjugados. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados modifican una o más propiedades del oligonucleótido unido, incluyendo pero sin limitarse a la farmacodinámica, farmacocinética, estabilidad, unión, absorción, distribución tisular, distribución celular, captación celular, carga y aclaramiento. En ciertas realizaciones, los grupos conjugados confieren una nueva propiedad al oligonucleótido unido, *por ejemplo*, fluoróforos o grupos informadores que permiten la detección del oligonucleótido. Ciertos grupos conjugados y fracciones conjugadas se han descrito anteriormente, por ejemplo: fracción de colesterol (Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), ácido cólico (Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1994, 4, 1053-1060), un tioéter, *p. ej.*, hexil-S-tritilitol (Manoharan et al., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1993, 3, 2765-2770), un tiocolesterol (Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), una cadena alifática, *p. ej.*, do-decan-diol o residuos de undecilo (Saison-Behmoaras et al., EMBO J., 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), un fosfolípido, por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato de trietilamonio (Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), una poliamina o una cadena de polietilenglicol (Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), o ácido adamantano acético una fracción de palmito (Mishra et al., Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), una fracción de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol (Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937), un grupo tocoferol (Nishina et al., Molecular Therapy Nucleic Acids, 2015, 4, e220; y Nishina et al., Molecular Therapy, 2008, 16, 734-740), o un grupo GalNAc (*por ejemplo*, documento WO2014/179620).

1. Fracciones Conjugadas

60 **[0164]** Las fracciones conjugadas incluyen, sin limitación, intercaladores, moléculas informadoras, poliaminas, poliamidas, péptidos, carbohidratos (*p. ej.*, GalNAc), fracciones vitamínicas, polietilenglicoles, tioéteres, poliéteres, colesteroles, tiocolesteroles, fracciones de ácido cólico, folato, lípidos, fosfolípidos, biotina, fenazina, fenantridina, antraquinona, adamantano, acridina, fluoresceínas, rodaminas, cumarinas, fluoróforos y colorantes.

65 **[0165]** En ciertas realizaciones, una molécula conjugada comprende un principio activo, por ejemplo, aspirina, warfarina, fenilbutazona, ibuprofeno, suprofen, fen-bufen, ketoprofeno, (S)-(+)-pranoprofeno, carprofeno, dansilsarcosina, ácido 2-,3,5-triidobenzoico, fingolimod, ácido flufenámico, ácido folínico, una benzotiadiazida, una clorotiazida, una diazepina,

una indo-meticina, un barbitúrico, una cefalosporina, una sulfamida, un antidiabético, un antibacteriano o un antibiótico.

2. Enlazadores conjugados

5 **[0166]** Las fracciones conjugadas se unen a los oligonucleótidos mediante enlazadores conjugados. En ciertos compuestos, el enlazador conjugado es un enlace químico simple (es decir, la fracción conjugada se une directamente a un oligonucleótido mediante un enlace simple). En ciertos compuestos, una fracción conjugada se une a un oligonucleótido a través de un enlazador conjugado más complejo que comprende una o más fracciones de enlazador conjugado, que son subunidades que forman un enlazador conjugado. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende una estructura de cadena, como una cadena de hidrocarbilo, o un oligómero de unidades repetitivas como etilenglicol, nucleósidos o unidades de aminoácidos.

15 **[0167]** En ciertas realizaciones, un enlazador conjugado comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxilamino. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida y éter. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende grupos seleccionados entre grupos alquilo y amida. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende grupos seleccionados entre grupos alquilo y éter. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende al menos una fracción de fósforo. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado comprende al menos un grupo fosfato. En ciertas realizaciones, el enlazador conjugado incluye al menos un grupo enlazador neutro.

20 **[0168]** En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados, incluyendo los enlazadores conjugados descritos anteriormente, son elementos de enlace bifuncionales, *por ejemplo*, aquellos conocidos en la técnica por ser útiles para unir grupos conjugados a compuestos parentales, tales como los oligonucleótidos proporcionados en el presente documento. En general, una fracción de enlace bifuncional comprende al menos dos grupos funcionales. Uno de los grupos funcionales se selecciona para unirse a un sitio concreto de un compuesto original y el otro se selecciona para unirse a un grupo conjugado. Los ejemplos de grupos funcionales utilizados en una fracción de enlace bifuncional incluyen, entre otros, electrófilos para reaccionar con grupos nucleófilos y nucleófilos para reaccionar con grupos electrófilos. En ciertas realizaciones, las fracciones de enlace bifuncionales comprenden uno o más grupos seleccionados entre amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, alquilo, alquenilo y alquinilo.

30 **[0169]** Ejemplos de enlazadores conjugados incluyen pero no se limitan a pirrolidina, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato de succinimidil (SMCC) y ácido 6-aminohexanoico (AHEx o AHA). Otros enlazadores conjugados incluyen pero no se limitan a alquilo C₁₀-C₂ sustituido o no sustituido, alquenilo C₁₀-C₂ sustituido o no sustituido o alquinilo C₁₀-C₁₀ sustituido o no sustituido, donde una lista no limitativa de grupos sustituyentes preferidos incluye hidroxilo, amino, alcoxi, carboxi, bencilo, fenilo, nitro, tiol, tioalcoxi, halógeno, alquilo, arilo, alquenilo y alquinilo.

40 **[0170]** En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden 1-10 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos enlazadores son nucleósidos modificados. En ciertas realizaciones, dichos nucleósidos enlazadores comprenden una fracción de azúcar modificada. En ciertas realizaciones, los nucleósidos enlazadores no están modificados. En ciertas realizaciones, los nucleósidos enlazadores comprenden una base heterocíclica opcionalmente protegida seleccionada entre una purina, una purina sustituida, una pirimidina o una pirimidina sustituida. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un nucleósido seleccionado entre uracilo, timina, citosina, 4-N-benzoilcitosina, 5-metilcitosina, 4-N-benzoil-5-metilcitosina, adenina, 6-N-benzoiladenina, guanina y 2-N-isobutirilguanina. Por lo general, es deseable que los nucleósidos enlazadores se separen del compuesto después de llegar al tejido diana. En consecuencia, los nucleósidos enlazadores suelen estar unidos entre sí y al resto del compuesto mediante enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, dichos enlaces escindibles son enlaces fosfodiéster.

50 **[0171]** En este caso, los nucleósidos enlazadores no se consideran parte del oligonucleótido. Por consiguiente, en las realizaciones en las que un compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido que consiste en un número o intervalo especificado de nucleósidos enlazados y/o un porcentaje especificado de complementariedad con un ácido nucleico de referencia y el compuesto oligomérico también comprende un grupo conjugado que comprende un enlazador conjugado que comprende nucleósidos enlazadores, esos nucleósidos enlazadores no se cuentan para la longitud del oligonucleótido y no se usan para determinar el porcentaje de complementariedad del oligonucleótido con el ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, un compuesto puede comprender (1) un oligonucleótido modificado formado por 8-30 nucleósidos y (2) un grupo conjugado formado por 1-10 nucleósidos enlazadores contiguos a los nucleósidos del oligonucleótido modificado. El número total de nucleósidos enlazados contiguos en un compuesto de este tipo es superior a 30. Alternativamente, un compuesto puede comprender un oligonucleótido modificado formado por 8-30 nucleósidos y sin grupo conjugado. El número total de nucleósidos enlazados contiguos en un compuesto de este tipo no es superior a 30. A menos que se indique lo contrario, los enlazadores conjugados no comprenden más de 10 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 5 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 3 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 2 nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, los enlazadores conjugados comprenden no más de 1 enlazador-nucleósido.

65 **[0172]** En ciertas realizaciones, es deseable que un grupo conjugado sea escindido del oligonucleótido. Por ejemplo, en

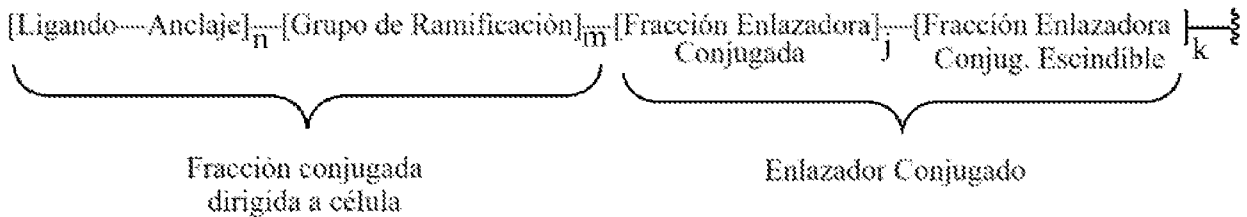
ciertas circunstancias, los compuestos que comprenden una fracción conjugada particular son mejor absorbidos por un tipo celular particular, pero una vez que el compuesto ha sido absorbido, es deseable que el grupo conjugado sea escindido para liberar el oligonucleótido no conjugado o parental. Así, ciertos enlazadores conjugados pueden comprender una o más fracciones escindibles. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un enlace escindible. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un grupo de átomos que comprende al menos un enlace escindible. En ciertas realizaciones, una fracción escindible comprende un grupo de átomos que tienen uno, dos, tres, cuatro o más de cuatro enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, una fracción escindible se escinde selectivamente dentro de una célula o compartimento subcelular, como un lisosoma. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es escindida selectivamente por enzimas endógenas, tales como nucleasas.

[0173] En ciertas realizaciones, un enlace escindible se selecciona entre: una amida, un éster, un éter, uno o ambos ésteres de un fosfodiéster, un éster de fosfato, un carbamato o un disulfuro. En ciertas realizaciones, un enlace escindible es uno o ambos de los ésteres de un fosfodiéster. En ciertas realizaciones, una fracción escindible comprende un fosfato o fosfodiéster. En ciertas realizaciones, la fracción escindible es un enlace fosfato entre un oligonucleótido y una fracción conjugada o grupo conjugado.

[0174] En ciertas realizaciones, una fracción escindible comprende o consiste en uno o más nucleósidos enlazadores. En ciertas realizaciones, uno o más nucleósidos enlazadores están unidos entre sí y/o al resto del compuesto mediante enlaces escindibles. En ciertas realizaciones, dichos enlaces escindibles son enlaces fosfodiéster no modificados. En ciertas realizaciones, una fracción escindible es un nucleósido 2'-desoxi que está unido al nucleósido 3' o 5'-terminal de un oligonucleótido mediante un enlace fosfato internucleósido y unido covalentemente al resto del enlazador conjugado o fracción conjugada mediante un enlace fosfato o fosforotioato. En ciertas realizaciones de este tipo, la fracción escindible es 2'-desoxiadenosina.3.

Ciertas Fracciones Conjugadas Dirigidas a Células

[0175] En ciertas realizaciones, un grupo conjugado comprende una fracción conjugada dirigida a células. En ciertas realizaciones, un grupo conjugado tiene la fórmula general:



donde n es de 1 a aproximadamente 3, m es 0 cuando n es 1, m es 1 cuando n es 2 o mayor, j es 1 o 0, y k es 1 o 0.

[0176] En ciertas realizaciones, n es 1, j es 1 y k es 0. En ciertas realizaciones, n es 1, j es 0 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 1, j es 1 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 2, j es 1 y k es 0. En ciertas realizaciones, n es 2, j es 0 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 2, j es 1 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 3, j es 1 y k es 0. En ciertas realizaciones, n es 3, j es 0 y k es 1. En ciertas realizaciones, n es 3, j es 1 y k es 1.

[0177] En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden fracciones dirigidas a células que tienen al menos un ligando ligado. En ciertas realizaciones, las fracciones dirigidas a las células comprenden dos ligandos unidos covalentemente a un grupo ramificado. En ciertas realizaciones, las fracciones dirigidas a las células comprenden tres ligandos unidos covalentemente a un grupo ramificado.

[0178] En ciertas realizaciones, la fracción dirigida a células comprende un grupo de ramificación que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter y grupos hidroxilamino. En ciertas realizaciones, el grupo ramificado comprende un grupo alifático ramificado que comprende grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter y grupos hidroxilamino. En ciertas realizaciones, el grupo alifático ramificado comprende grupos seleccionados entre alquilo, amino, oxo, amida y éter. En ciertas realizaciones de este tipo, el grupo alifático ramificado comprende grupos seleccionados entre grupos alquilo, amino y éter. En ciertas realizaciones de este tipo, el grupo alifático ramificado comprende grupos seleccionados entre grupos alquilo y éter. En ciertas realizaciones, el grupo de ramificación comprende un sistema de anillo mono o policíclico.

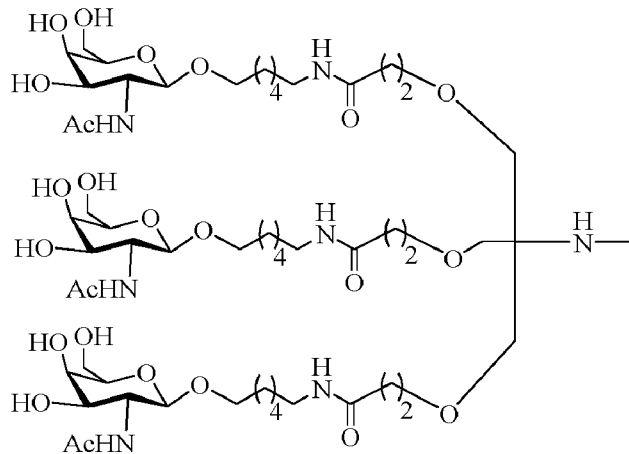
[0179] En ciertas realizaciones, cada anclaje de una fracción dirigida a células comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, alquilo sustituido, éter, tioéter, disulfuro, amino, oxo, amida, fosfodiéster y polietilenglicol, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, éter, tioéter, disulfuro, amino, oxo, amida y polietilenglicol, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, fosfodiéster, éter, amino, oxo y amida, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, éter, amino, oxo y amido, en cualquier

combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo, amino y oxo, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo y oxo, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje es un grupo alifático lineal que comprende uno o más grupos seleccionados entre alquilo y fosfodiéster, en cualquier combinación. En ciertas realizaciones, cada anclaje comprende al menos un grupo de enlace fosforoso o un grupo de enlace neutro. En ciertas realizaciones, cada anclaje comprende una cadena de entre 6 y 20 átomos de longitud. En ciertas realizaciones, cada anclaje comprende una cadena de entre 10 y 18 átomos de longitud. En ciertas realizaciones, cada anclaje tiene aproximadamente 10 átomos de longitud de cadena.

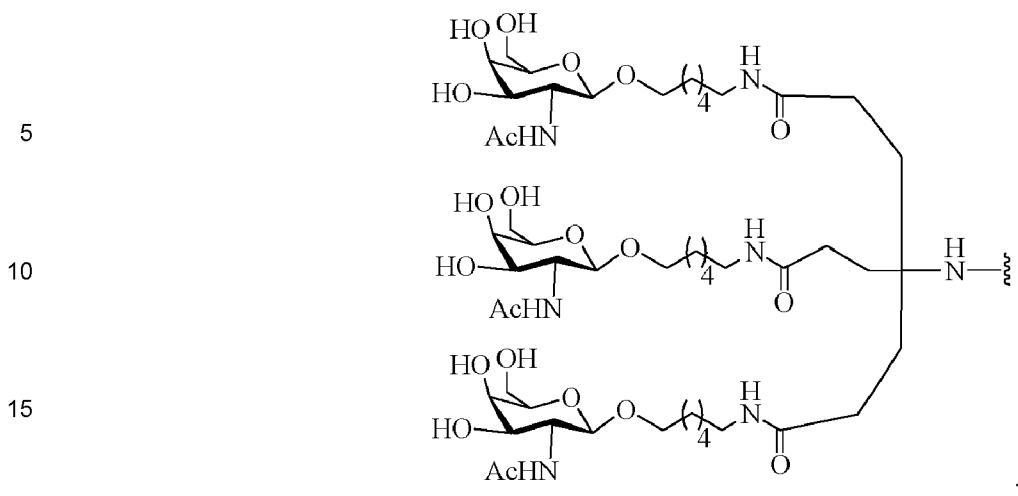
[0180] En ciertas realizaciones, cada ligando de una fracción dirigida a células tiene afinidad por al menos un tipo de receptor en una célula diana. En ciertas realizaciones, cada ligando tiene afinidad por al menos un tipo de receptor en la superficie de una célula hepática de mamífero. En ciertas realizaciones, cada ligando tiene afinidad por el receptor de asialoglicoproteína hepática (ASGP-R). En ciertas realizaciones, cada ligando es un carbohidrato. En ciertas realizaciones, cada ligando se selecciona independientemente entre galactosa, N-acetil galactosamina (GalNAc), manosa, glucosa, glucoseamina y fucosa. En ciertas realizaciones, cada ligando es N-acetil galactosamina (GalNAc). En ciertas realizaciones, la fracción dirigida a células comprende 3 ligandos GalNAc. En ciertas realizaciones, la fracción dirigida a células comprende 2 ligandos GalNAc. En ciertas realizaciones, la fracción dirigida a las células comprende un ligando GalNAc.

[0181] En ciertas realizaciones, cada ligando de una fracción dirigida a células es un hidrato de carbono, un derivado de hidrato de carbono, un hidrato de carbono modificado, un polisacárido, un polisacárido modificado o un derivado de polisacárido. En ciertas realizaciones, el grupo conjugado comprende un grupo de hidratos de carbono (véase, por ejemplo, Maier et al., "Synthesis of Antisense Oligonucleotides Conjugated to a Multivalent Carbohydrate Cluster for Cellular Targeting," *Bioconjugate Chemistry*, 2003, 14, 18-29 o Rensen et al., "Design and Synthesis of Novel N-Acetylgalactosamine-Terminated Glycolipids for Targeting of Lipoproteins to the Hepatic Asialoglycoprotein Receptor," *J. Med. Chem.* 2004, 47, 5798-5808). En ciertas realizaciones, cada ligando es un aminoazúcar o un tioazúcar. Por ejemplo, los aminoazúcares pueden seleccionarse de entre cualquier número de compuestos conocidos en la técnica, como el ácido siálico, la α -D-galactosamina, el ácido β -murámico, la 2-deoxi-2-metilamino-L-glucopiranososa, la 4,6-dideoxi-4-formamido-2,3-di-O-metil-D-manopiranososa, la 2-deoxi-2-sulfoamino-D-glucopiranososa y la N-sulfo-D-glucosamina, y el ácido N-glicolil- α -neuramínico. Por ejemplo, los tioazúcares pueden seleccionarse entre la 5-tio- β -D-glucopiranososa, el metil 2,3,4-tri-O-acetil-1-tio-6-O-tritil- α -D-glucopiranosido, la 4-tio- β -D-galactopiranososa y el etil 3,4,6,7-tetra-O-acetil-2-deoxi-1,5-ditio- α -D-gluco-heptopiranosido.

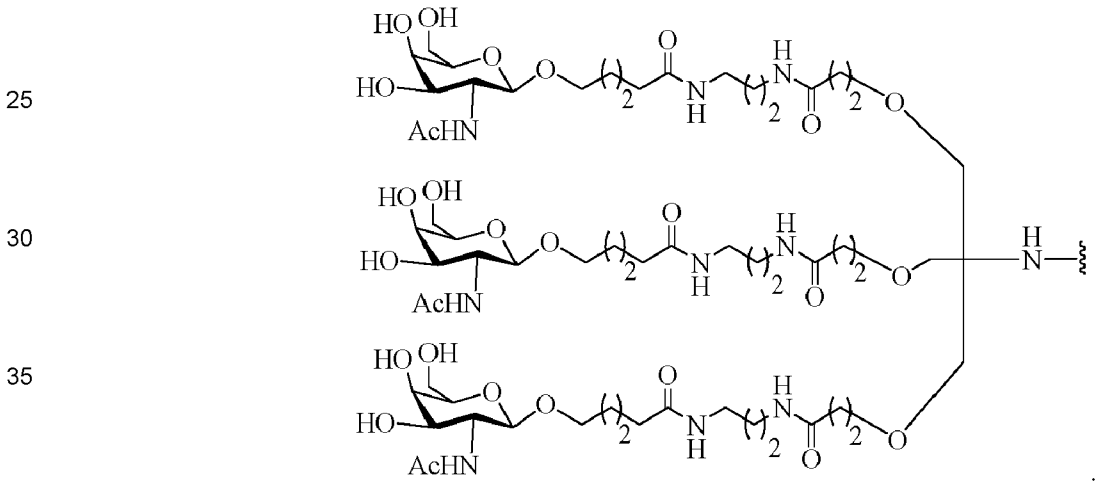
[0182] En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden una fracción dirigida a células que tiene la fórmula:



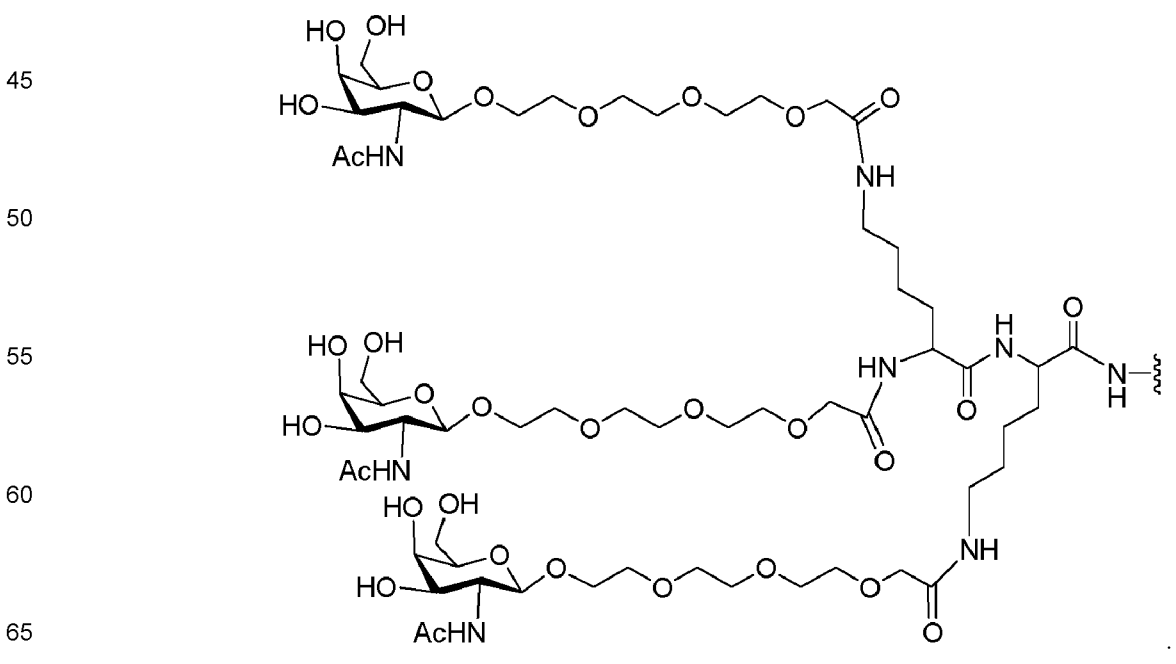
[0183] En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden una fracción dirigida a células que tiene la fórmula:

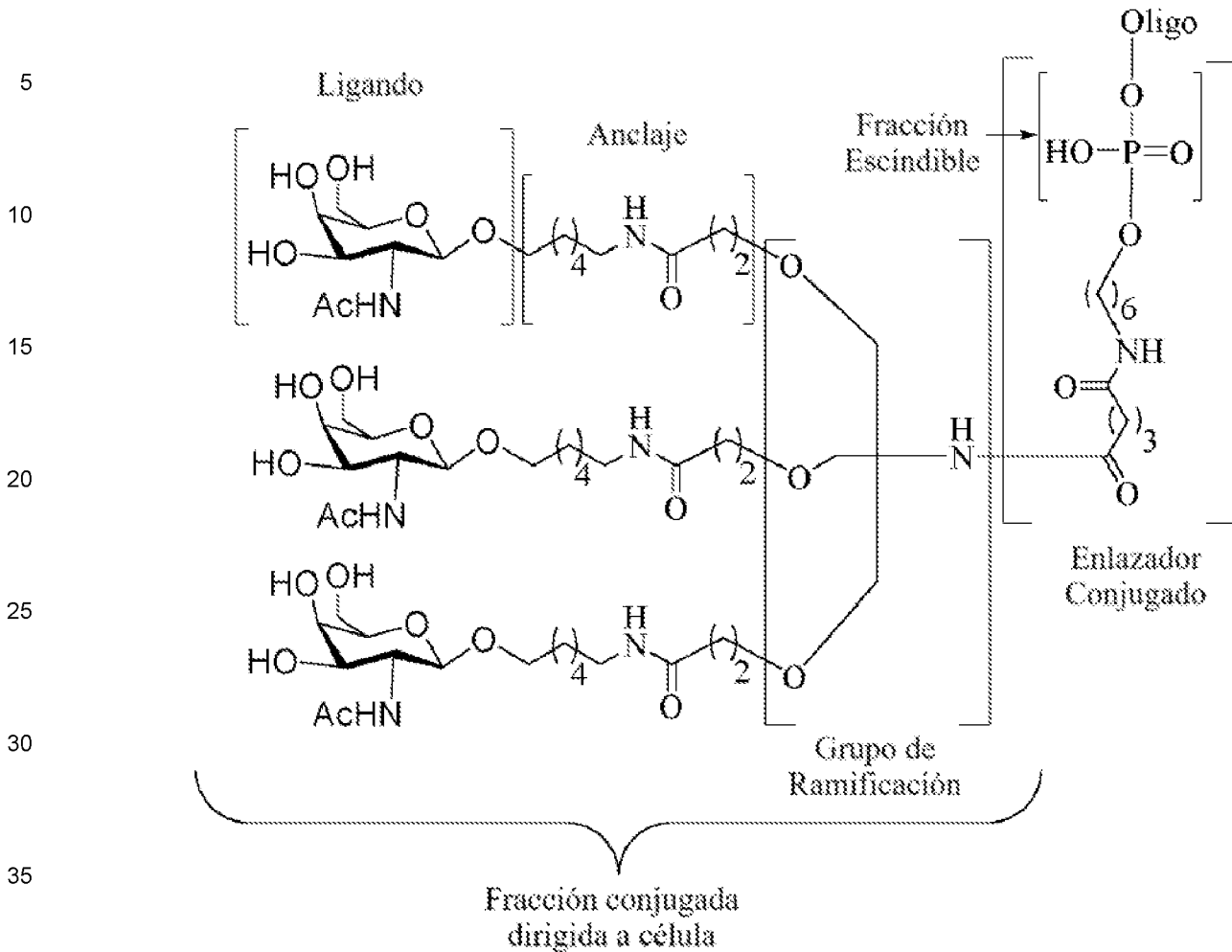


20 **[0184]** En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden una fracción dirigida a células que tiene la fórmula:



45 **[0185]** En ciertas realizaciones, los grupos conjugados comprenden una fracción dirigida a células que tiene la fórmula:





donde oligo es un oligonucleótido.

[0189] Patentes representativas de los Estados Unidos, publicaciones de solicitud de patente de los Estados Unidos, publicaciones de solicitud de patente internacional, y otras publicaciones que enseñan la preparación de ciertos de los grupos conjugados anteriormente mencionados, compuestos que comprenden grupos conjugados, ancladores, enlazadores conjugados, grupos de ramificación, ligandos, fracciones escindibles, así como otras modificaciones incluyen, sin limitación, documentos US 5,994,517, US 6,300,319, US 6,660,720, US 6,906,182, US 7,262,177, US 7,491,805, US 8,106,022, US 7,723,509, US 2006/0148740, US 2011/0123520, WO 2013/033230 y WO 2012/037254, Biessen et al., J. Med. Chem. 1995, 38, 1846-1852, Lee et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry 2011,19, 2494-2500, Rensen et al., J. Biol. Chem. 2001, 276, 37577-37584, Rensen et al., J. Med. Chem. 2004, 47, 5798-5808, Sliedregt et al., J. Med. Chem. 1999, 42, 609-618, and Valentijn et al., Tetrahedron, 1997, 53, 759-770.

[0190] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados comprenden un motivo de azúcar *gapmer* o totalmente modificado y un grupo conjugado que comprende al menos uno, dos o tres ligandos GalNAc. En ciertas realizaciones, los compuestos comprenden un grupo conjugado que se encuentra en cualquiera de las siguientes referencias: Lee, Carbohydr Res, 1978, 67, 509-514; Connolly et al., J Biol Chem, 1982, 257, 939-945; Pavia et al., Int J Pep Protein Res, 1983, 22, 539-548; Lee et al., Biochem, 1984, 23, 4255-4261; Lee et al., Glycoconjugate J, 1987, 4, 317-328; Toyokuni et al., Tetrahedron Lett, 1990, 31, 2673-2676; Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1538-1546; Valentijn et al., Tetrahedron, 1997, 53, 759-770; Kim et al., Tetrahedron Lett, 1997, 38, 3487-3490; Lee et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 762-765; Kato et al., Glycobiol, 2001, 11, 821-829; Rensen et al., J Biol Chem, 2001, 276, 37577-37584; Lee et al., Methods Enzymol, 2003, 362, 38-43; Westerlind et al., Glycoconj J, 2004, 21, 227-241; Lee et al., Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(19), 5132-5135; Maierhofer et al., Bioorg Med Chem, 2007, 15, 7661-7676; Khorev et al., Bioorg Med Chem, 2008, 16, 5216-5231; Lee et al., Bioorg Med Chem, 2011, 19, 2494-2500; Kornilova et al., Analyt Biochem, 2012, 425, 43-46; Pujol et al., Angew Chemie Int Ed Engl, 2012, 51, 7445-7448; Biessen et al., J Med Chem, 1995, 38, 1846-1852; Sliedregt et al., J Med Chem, 1999, 42, 609-618; Rensen et al., J Med Chem, 2004, 47, 5798-5808; Rensen et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26, 169-175; van Rossenberg et al., Gene Ther, 2004, 11, 457-464; Sato et al., J Am Chem Soc, 2004, 126, 14013-14022; Lee et al., J Org Chem, 2012, 77, 7564-7571; Biessen et al., FASEB J, 2000, 14, 1784-1792; Rajur et al., Bioconjug Chem, 1997, 8, 935-940; Duff et al., Methods Enzymol, 2000, 313, 297-321; Maier et al., Bioconjug Chem, 2003,

14, 18-29; Jayaprakash et al., Org Lett, 2010, 12, 5410-5413; Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002, 12, 103-128; Merwin et al., Bioconjug Chem, 1994, 5, 612-620; Tomiya et al., Bioorg Med Chem, 2013, 21, 5275-5281; solicitudes Internacionales WO1998/013381; WO2011/038356; WO1997/046098; WO2008/098788; WO2004/101619; WO2012/037254; WO2011/120053; WO2011/100131; WO2011/163121; WO2012/177947; WO2013/033230; WO2013/075035; WO2012/083185; WO2012/083046; WO2009/082607; WO2009/134487; WO2010/144740; WO2010/148013; WO1997/020563; WO2010/088537; WO2002/043771; WO2010/129709; WO2012/068187; WO2009/126933; WO2004/024757; WO2010/054406; WO2012/089352; WO2012/089602; WO2013/166121; WO2013/165816; U.S. Patentes de EE. UU. 4.751.219; 8.552.163; 6.908.903; 7.262.177; 5.994.517; 6.300.319; 8.106.022; 7.491.805; 7.582.744; 8.137.695; 6.383.812; 6.525.031; 6.660.720; 7.723.509; 8.541.548; 8.344.125; 8.313.772; 8.349.308; 8.450.467; 8.501.930; 8.158.601; 7.262.177; 6.906.182; 6.620.916; 8.435.491; 8.404.862; 7.851.615; Publicaciones de Solicitudes de Patente de EE.UU. Publicadas US2011/0097264; US2011/0097265; US2013/0004427; US2005/0164235; US2006/0148740; US2008/0281044; US2010/0240730; US2003/0119724; US2006/0183886; US2008/0206869; US2011/0269814; US2009/0286973; US2011/0207799; US2012/0136042; US2012/0165393; US2008/0281041; US2009/0203135; US2012/0035115; US2012/0095075; US2012/0101148; US2012/0128760; US2012/0157509; US2012/0230938; US2013/0109817; US2013/0121954; US2013/0178512; US2013/0236968; US2011/0123520; US2003/0077829; US2008/0108801; y US2009/0203132.

VII. Ciertas composiciones farmacéuticas

[0191] Se describen en el presente documento composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más compuestos oligoméricos, tal como se definen en las reivindicaciones. En ciertas realizaciones, cada uno de los uno o más compuestos oligoméricos consiste en un oligonucleótido modificado. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende o consiste en una solución salina y uno o más compuestos oligoméricos. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende o consiste en una solución salina estéril y uno o más compuestos oligoméricos. En ciertas realizaciones, la solución salina estéril es de grado farmacéutico. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende o consiste en uno o más compuestos oligoméricos y agua. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende o consiste en uno o más compuestos oligoméricos y agua estéril. En ciertas realizaciones, el agua estéril es agua de calidad farmacéutica. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica comprende o consiste en uno o más compuestos oligoméricos y solución salina tamponada con fosfato (PBS). En ciertas realizaciones, el PBS estéril es PBS de grado farmacéutico.

[0192] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más compuestos oligoméricos y uno o más excipientes. En ciertas realizaciones, los excipientes se seleccionan entre agua, soluciones salinas, alcohol, polietilenglicoles, gelatina, lactosa, amilasa, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona.

[0193] En ciertas realizaciones, los compuestos oligoméricos pueden mezclarse con sustancias activas y/o inertes farmacéuticamente aceptables para la preparación de composiciones o formulaciones farmacéuticas. Las composiciones y los métodos para la formulación de composiciones farmacéuticas dependen de una serie de criterios, entre los que se incluyen la vía de administración, el alcance de la enfermedad o la dosis a administrar.

[0194] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto oligomérico abarcan cualesquiera sales farmacéuticamente aceptables del compuesto oligomérico, ésteres del compuesto oligomérico o sales de tales ésteres. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas que comprenden compuestos antisentido que comprenden uno o más oligonucleótidos antisentido, tras su administración a un animal, incluido un humano, son capaces de proporcionar (directa o indirectamente) el metabolito biológicamente activo o el residuo del mismo. En consecuencia, por ejemplo, la divulgación también se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de compuestos oligoméricos, profármacos, sales farmacéuticamente aceptables de dichos profármacos y otros bioequivalentes. Las sales farmacéuticamente aceptables adecuadas incluyen, entre otras, las sales de sodio y potasio. En ciertas realizaciones, los profármacos comprenden uno o más grupos conjugados unidos a un oligonucleótido, en el que el grupo conjugado es escindido por nucleasas endógenas dentro del organismo.

[0195] Las fracciones lipídicas se han utilizado en terapias con ácidos nucleicos para su uso en una variedad de métodos. En algunos de estos usos, el ácido nucleico, como un compuesto oligomérico, se introduce en liposomas o lipoplejos preformados hechos de mezclas de lípidos catiónicos y lípidos neutros. En ciertos métodos, se forman complejos de ADN con lípidos mono o policationicos sin la presencia de un lípido neutro. En ciertas realizaciones, se selecciona una fracción lipídica para aumentar la distribución de un agente farmacéutico en una célula o tejido concreto. En ciertas realizaciones, se selecciona una fracción lipídica para aumentar la distribución de un agente farmacéutico en el tejido adiposo. En ciertas realizaciones, se selecciona una fracción lipídica para aumentar la distribución de un agente farmacéutico en el tejido muscular.

[0196] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un sistema de administración. Algunos ejemplos de sistemas de administración son, entre otros, los liposomas y las emulsiones. Ciertos sistemas de administración son útiles para preparar ciertas composiciones farmacéuticas, incluidas las que comprenden compuestos

hidrófobos. En ciertas realizaciones, se utilizan ciertos disolventes orgánicos como el dimetilsulfóxido.

[0197] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden una o más moléculas de administración específicas de tejido diseñadas para administrar uno o más agentes farmacéuticos que comprenden un compuesto oligomérico proporcionado en el presente documento a tejidos o tipos celulares específicos. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas incluyen liposomas recubiertos con un anticuerpo específico de tejido.

[0198] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un sistema co-solvente. Algunos de estos sistemas cosolventes incluyen, por ejemplo, alcohol bencílico, un tensioactivo no polar, un polímero orgánico miscible en agua y una fase acuosa. En ciertas realizaciones, tales sistemas co-solventes se utilizan para compuestos hidrofóbicos. Un ejemplo no limitante de tal sistema co-disolvente es el sistema co-disolvente VPD, que es una solución de etanol absoluto que comprende 3% p/v de alcohol bencílico, 8% p/v del tensioactivo no polar Polisorbato 80™ y 65% p/v de polietilenglicol 300. Las proporciones de dichos sistemas de co-disolventes pueden variar considerablemente sin alterar significativamente sus características de solubilidad y toxicidad. Además, puede variarse la identidad de los componentes del cosolvente: por ejemplo, pueden utilizarse otros tensioactivos en lugar de Polisorbato 80™, puede variarse el tamaño de la fracción de polietilenglicol; otros polímeros biocompatibles pueden sustituir al polietilenglicol, por ejemplo, la polivinilpirrolidona; y otros azúcares o polisacáridos pueden sustituir a la dextrosa.

[0199] En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración oral. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se preparan para administración bucal. En ciertas realizaciones, se prepara una composición farmacéutica para su administración por inyección (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intratecal (IT), intracerebroventricular (ICV), intraneural, perineural, etc.). En algunas de dichas realizaciones, una composición farmacéutica comprende un portador y se formula en solución acuosa, como agua o tampones fisiológicamente compatibles, como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. En ciertas realizaciones, se incluyen otros ingredientes (p. ej., ingredientes que ayudan a la solubilidad o sirven como conservantes). En ciertas realizaciones, las suspensiones inyectables se preparan utilizando portadores líquidos apropiados, agentes de suspensión y similares. Algunas composiciones farmacéuticas inyectables se presentan en forma de dosis unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis. Algunas composiciones farmacéuticas inyectables son suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes formuladores como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Ciertos disolventes adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas inyectables incluyen, entre otros, disolventes lipofílicos y aceites grasos, como el aceite de sésamo, ésteres sintéticos de ácidos grasos, como el oleato de etilo o los triglicéridos, y liposomas.

[0200] Bajo ciertas condiciones, ciertos compuestos divulgados aquí actúan como ácidos. Aunque dichos compuestos pueden dibujarse o describirse en forma protonada (ácido libre), o ionizada y en asociación con una forma catiónica (sal), las soluciones acuosas de dichos compuestos existen en equilibrio entre dichas formas. Por ejemplo, un enlace fosfato de un oligonucleótido en solución acuosa existe en equilibrio entre las formas de ácido libre, anión y sal. A menos que se indique lo contrario, los compuestos aquí descritos incluyen todas estas formas. Además, ciertos oligonucleótidos tienen varios enlaces de este tipo, cada uno de los cuales está en equilibrio. Así, los oligonucleótidos en solución existen en un conjunto de formas en múltiples posiciones, todas ellas en equilibrio. El término "oligonucleótido" incluye todas estas formas. Las estructuras dibujadas representan necesariamente una única forma. No obstante, a menos que se indique lo contrario, dichos dibujos también pretenden incluir las formas correspondientes. En el presente documento, una estructura que represente el ácido libre de un compuesto seguido del término "o sal del mismo" incluye expresamente todas las formas que puedan estar total o parcialmente protonadas/desprotonadas/en asociación con un catión. En algunos casos, se identifican uno o más cationes específicos.

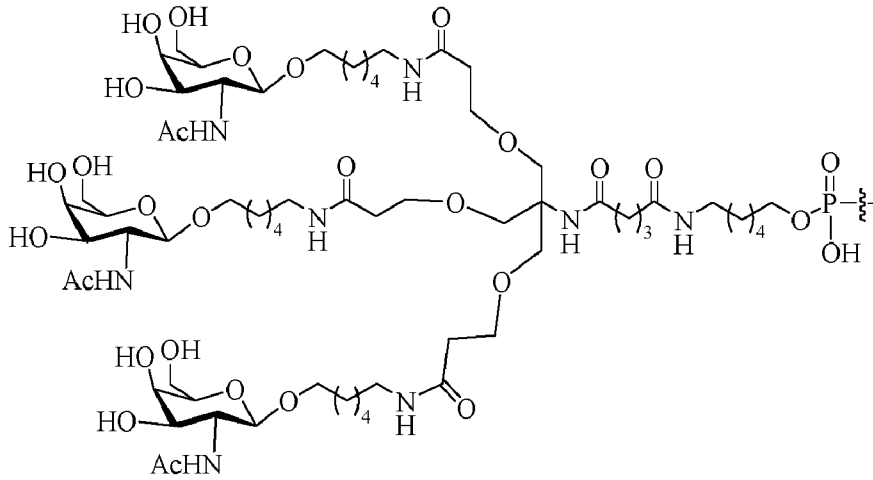
[0201] En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos o compuestos oligoméricos modificados están en solución acuosa con sodio. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos o compuestos oligoméricos modificados están en solución acuosa con potasio. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados o los compuestos oligoméricos están en PBS. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos modificados o los compuestos oligoméricos están en agua. En ciertas realizaciones, el pH de la solución se ajusta con NaOH y/o HCl para alcanzar el pH deseado.

[0202] A continuación se describen ciertas dosis específicas. Una dosis puede tener la forma de una unidad de dosificación. Para mayor claridad, una dosis (o unidad de dosificación) de un oligonucleótido modificado o de un compuesto oligomérico en miligramos indica la masa de la forma ácida libre del oligonucleótido modificado o del compuesto oligomérico. Como se ha descrito anteriormente, en solución acuosa, el ácido libre está en equilibrio con las formas aniónica y salina. Sin embargo, a efectos del cálculo de la dosis, se supone que el oligonucleótido o compuesto oligomérico modificado existe como un ácido libre de disolvente, libre de acetato de sodio, anhidro y libre. Por ejemplo, cuando un oligonucleótido modificado o un compuesto oligomérico está en solución que comprende sodio (por ejemplo, solución salina), el oligonucleótido modificado o el compuesto oligomérico puede estar parcial o totalmente desprotonado y en asociación con iones Na⁺. Sin embargo, la masa de los protones se tiene en cuenta para el peso de la dosis, y la masa de los iones Na⁺ no se tiene en cuenta para el peso de la dosis. Cuando un compuesto oligomérico comprende un grupo conjugado, la masa del grupo conjugado se incluye en el cálculo de la dosis de dicho compuesto oligomérico. Si el grupo conjugado también tiene un ácido, se supone igualmente que el grupo conjugado está totalmente protonado a efectos del cálculo de la dosis.

VIII. Ciertas composiciones

1. Compuesto N.º 1205407

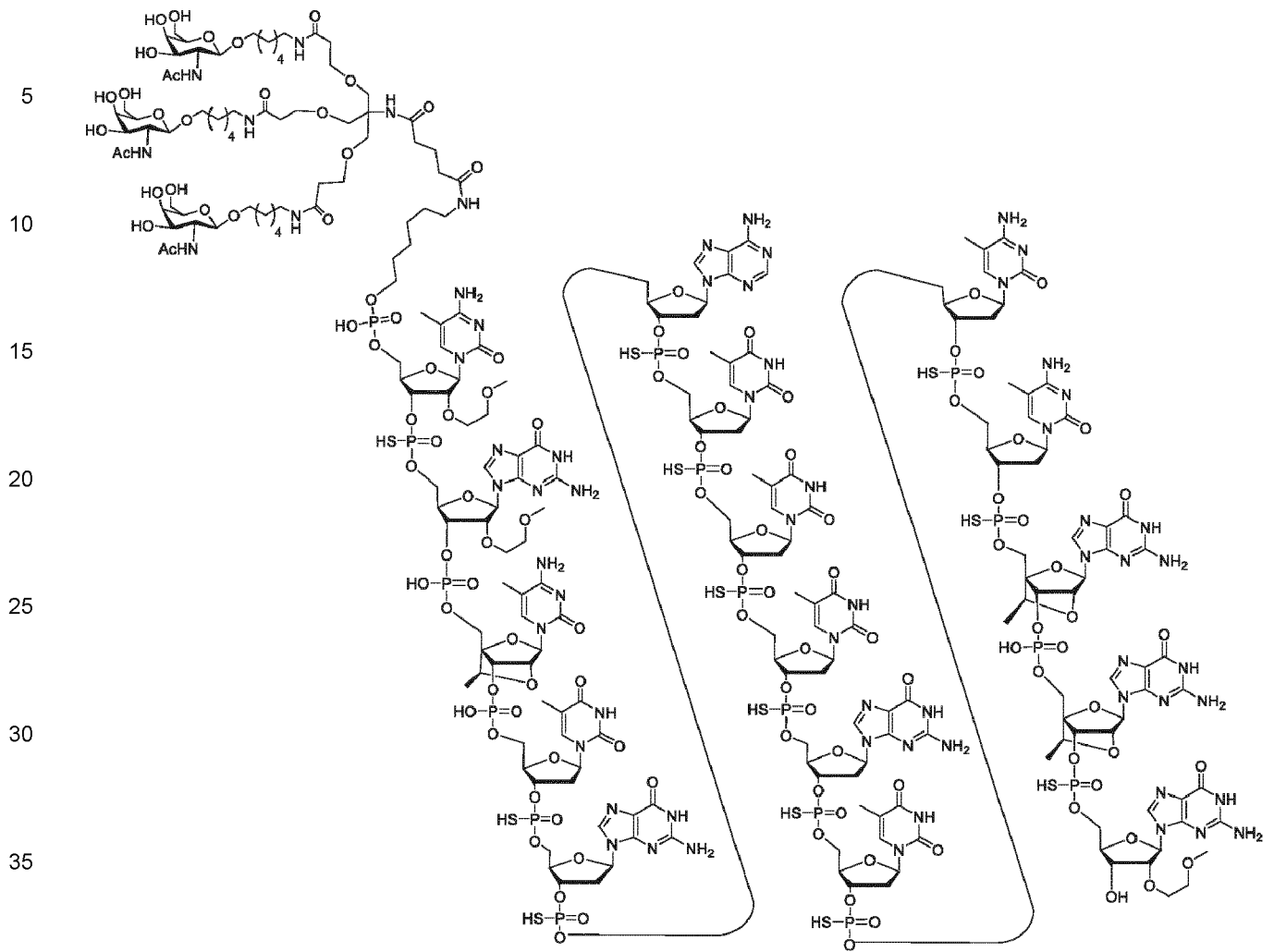
5 **[0203]** En ciertas realizaciones, el Compuesto N.º 1205407 se caracteriza por ser un *gapmer* de ala mixta 3-10-3 MOE/cEt conjugado en el extremo 5' con un grupo conjugado. El compuesto 1205407 tiene una secuencia (de 5' a 3') de CGCTGATTGTCCGGG (SEQ ID N.º: 12), donde los nucleósidos 1-3 tienen modificaciones de azúcar de e-e-k (de 5' a 3'), donde los nucleósidos 14-16 tienen modificaciones de azúcar de k-k-e, donde cada "e" representa una fracción de azúcar 2'-MOE, y cada "k" se refiere a una fracción de azúcar cEt; y cada uno de los nucleósidos 4-13 son 2'-β-D-desoxinucleósidos; en los que los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 2 a 3, 3 a 4, y 14 a 15 son enlaces internucleósidos fosfodiéster y los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 1 a 2, 4 a 5, 5 a 6, 6 a 7, 7 a 8, 8 a 9, 9 a 10, 10 a 11, 11 a 12, 12 a 13, 13 a 14, y 15 a 16 son enlaces internucleósidos fosforotioato, y en los que cada citosina es una 5-metilcitosina. El compuesto N.º 1205407 tiene una protección terminal 5'-trishexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃, representada por la estructura siguiente, en la que el grupo fosfato está unido al átomo 5'-oxígeno del 5'-nucleósido:



35 **[0204]** En ciertas realizaciones, el Compuesto No. 1205407 está representado por la siguiente notación química: THA-C₆-GalNAc₃-^mC_{es}G_{eo} ^mC_{ko}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds} ^mC_{ds} ^mC_{ds}G_{ko}G_{ks}G_e (SEQ ID N.º: 12), en la que:

- A = una nucleobase de adenina,
- ^mC = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- e = una fracción de azúcar 2'-β-D-MOE,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- s = un enlace internucleósido fosforotioato, y
- o = un enlace fosfodiéster internucleósido.

50 **[0205]** En ciertas realizaciones, el Compuesto N.º 1205407 está representado por la siguiente estructura química:



5

10

15

20

25

30

35

40

(SEQ ID N.º: o una sal del mismo.

[0206] En ciertas realizaciones, la sal de sodio del Compuesto N.º 1205407 está representada por la siguiente estructura química:

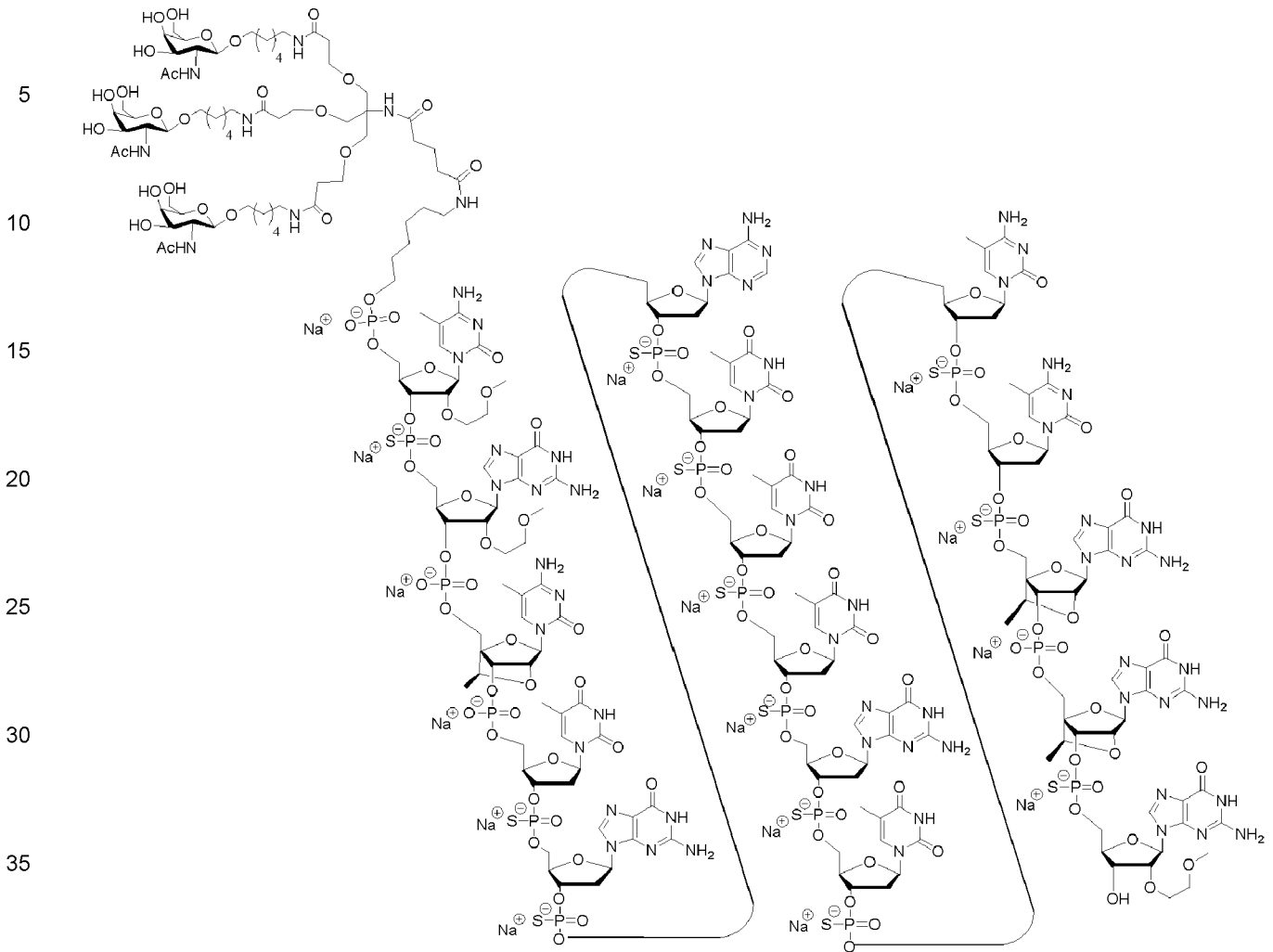
45

50

55

60

65



(SEQ ID N.º: 12).

[0207] En ciertas realizaciones, el Compuesto N.º 1205407 está en forma aniónica.

2. Compuesto N.º 1205408

[0208] El compuesto No. 1205408 puede caracterizarse como un *gapmer* de ala mixta 3-10-3 MOE/cEt conjugado en el extremo 5'a un grupo conjugado. El compuesto 1205408 tiene una secuencia (de 5' a 3') de TCGGTTGGAATTCTTT (SEQ ID N.º: 13), donde los nucleósidos 1-3 tienen modificaciones de azúcar de e-k-k (de 5' a 3') y donde los nucleósidos 14-16 tienen modificaciones de azúcar de k-k-e; donde cada "e" representa una fracción de azúcar 2'- MOE, y cada "k" se refiere a una fracción de azúcar cEt; y cada uno de los nucleósidos 4-13 son 2'-β-D-desoxinucleósidos; donde los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 2 a 3, 3 a 4, y 14 a 15 son enlaces internucleósidos fosfodiéster y los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 1 a 2, 4 a 5, 5 a 6, 6 a 7, 7 a 8, 8 a 9, 9 a 10, 10 a 11, 11 a 12, 12 a 13, 13 a 14, y 15 a 16 son enlaces internucleósidos fosforotioato, y donde cada citosina es una 5-metil citosina. El compuesto N.º 1205408 tiene una protección terminal 5'-trishexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃, representada por la siguiente estructura, en la que el grupo fosfato está unido al átomo 5'-oxígeno del 5'-nucleósido:

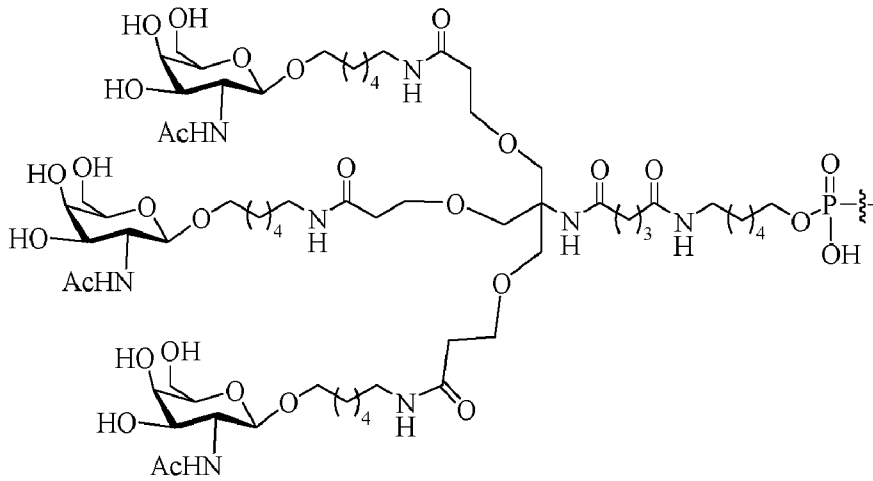
60

65

5

10

15



20

[0209] El compuesto N.º 1205408 puede representarse mediante la siguiente notación química: THA-C6-GalNAc₃-T_{es}^{mC}_{ko}G_{ko}G_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}^{mC}_{ds}T_{ko}T_{ks}T_e (SEQ ID N.º: 13), en la que:

25

- A = una nucleobase de adenina,
- ^{mC} = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- e = una fracción de azúcar 2'-β-D-MOE,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- s = un enlace internucleósido fosforotioato, y
- o = un enlace fosfodiéster internucleósido.

30

[0210] El compuesto N.º 1205408 puede estar representado por la siguiente estructura química:

35

40

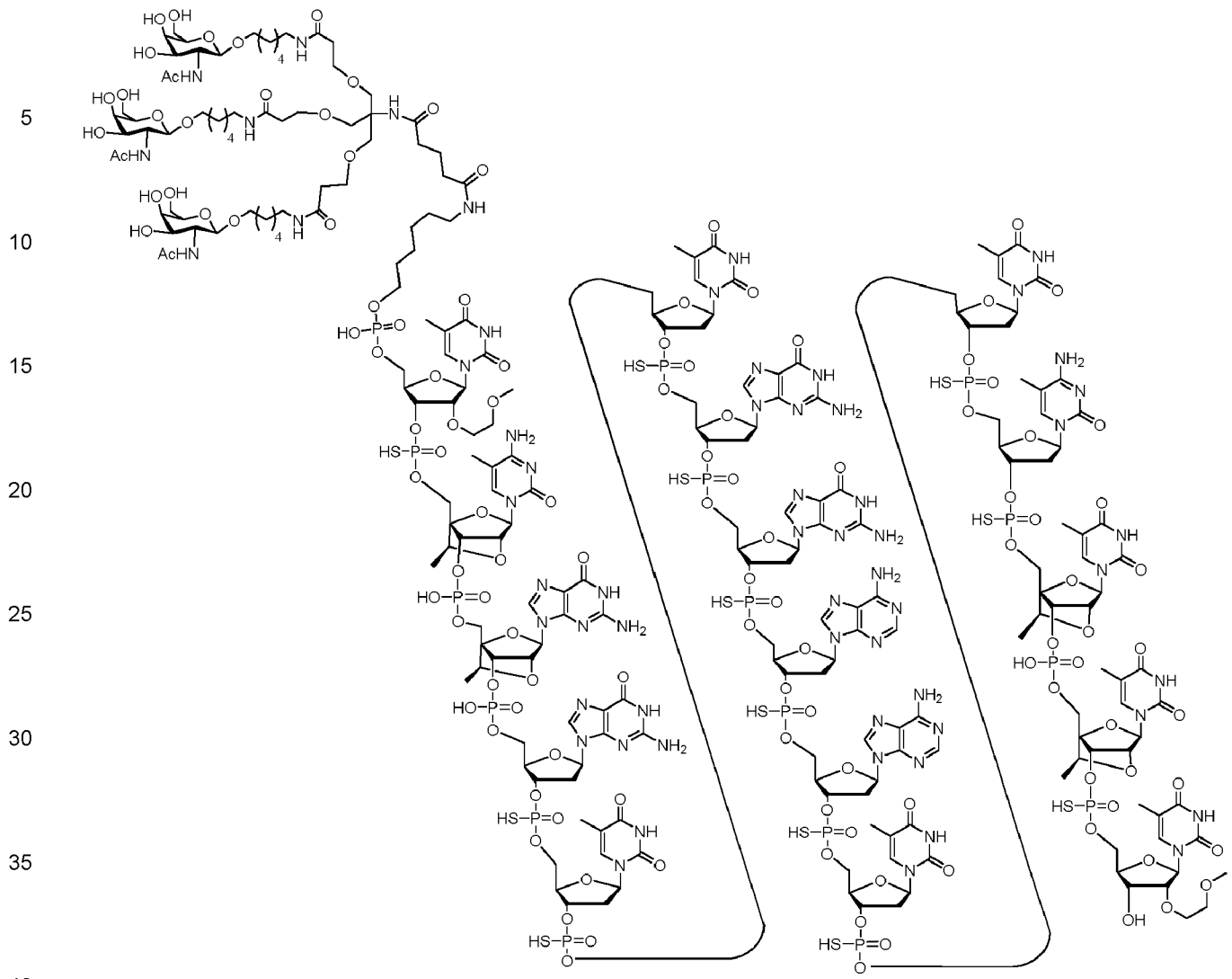
45

50

55

60

65



(SEQ ID N.º: 13) o una sal del mismo.

[0211] La sal sódica del Compuesto N.º 1205408 puede estar representada por la siguiente estructura química:

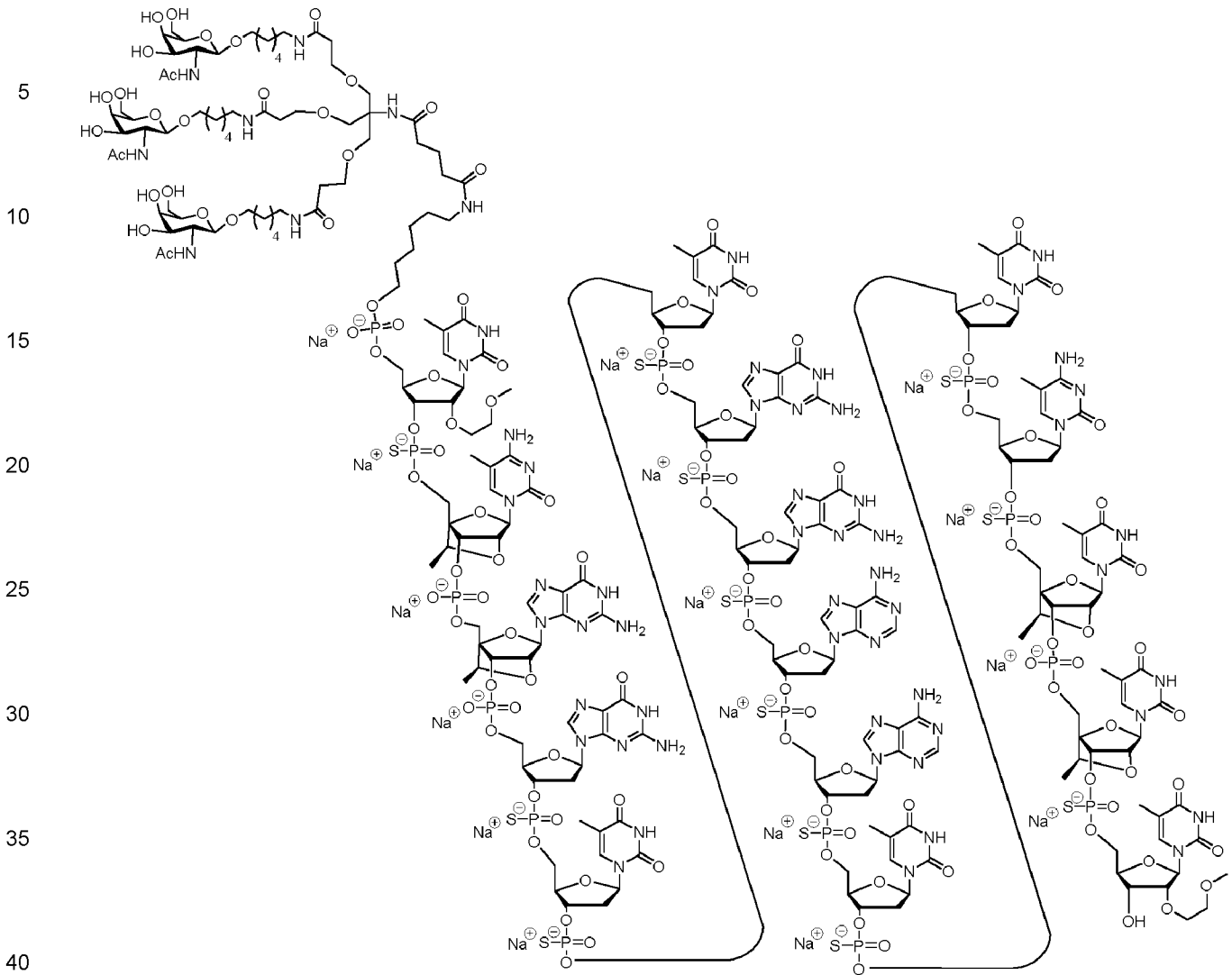
45

50

55

60

65



(SEQ ID N.º: 13).

[0212] El compuesto N.º 1205408 puede estar en forma aniónica.

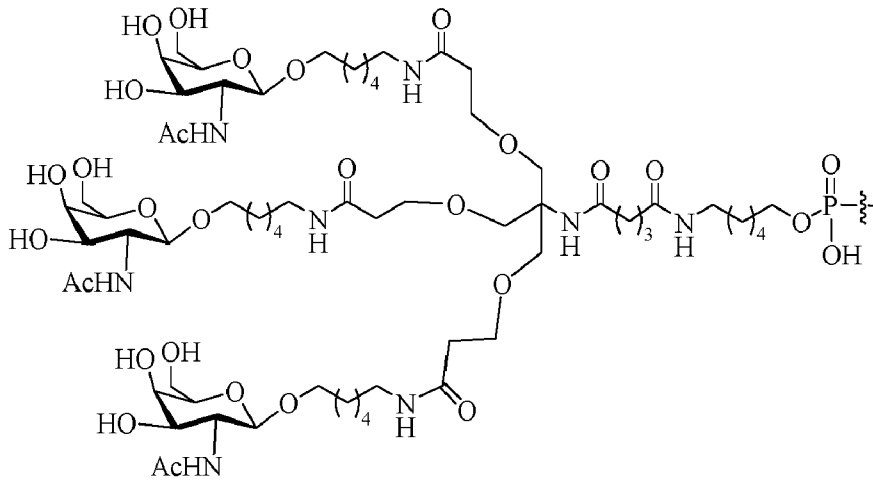
3. Compuesto N.º 1250837

[0213] El compuesto N.º 1250837 puede caracterizarse como un *gapmer* 3-10-3 conjugado en el extremo 5' con un grupo conjugado. El compuesto 1250837 tiene una secuencia (de 5' a 3') de GTCGGTTGGAATTCTT (SEQ ID N.º: 15), donde los nucleósidos 1-3 y 14-16 tienen modificaciones de azúcar cEt, donde el nucleósido 5 tiene un azúcar ribosa 2'-OMe, y donde cada uno de los nucleósidos 4 y 6-13 son 2'-β-D-desoxinucleósidos; donde cada enlace internucleósido entre los nucleósidos es un enlace internucleósido fosforotioato, y donde cada citosina es una 5-metil citosina. El compuesto N.º 1250837 tiene una protección terminal 5'-trishexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃, representada por la estructura siguiente, en la que el grupo fosfato está unido al átomo 5'-oxígeno del 5'-nucleósido:

5

10

15



20

[0214] El compuesto N.º 1250837 puede representarse mediante la siguiente notación química: $\text{THA-C6-GalNAc}_3\text{-G}_{ks}\text{T}_{ks}{}^m\text{C}_{ks}\text{G}_{ds}\text{G}_{ys}\text{T}_{ds}\text{T}_{ds}\text{G}_{ds}\text{G}_{ds}\text{A}_{ds}\text{A}_{ds}\text{T}_{ds}\text{T}_{ds}{}^m\text{C}_{ks}\text{T}_{ks}\text{T}_k$ (SEQ ID N.º: 15), en la que:

25

- A = una nucleobase de adenina,
- ${}^m\text{C}$ = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- y = una fracción de azúcar ribosa 2'-OMe, y
- s = un enlace internucleósido fosfortioato.

30

[0215] El compuesto N.º 1250837 puede estar representado por la siguiente estructura química:

35

40

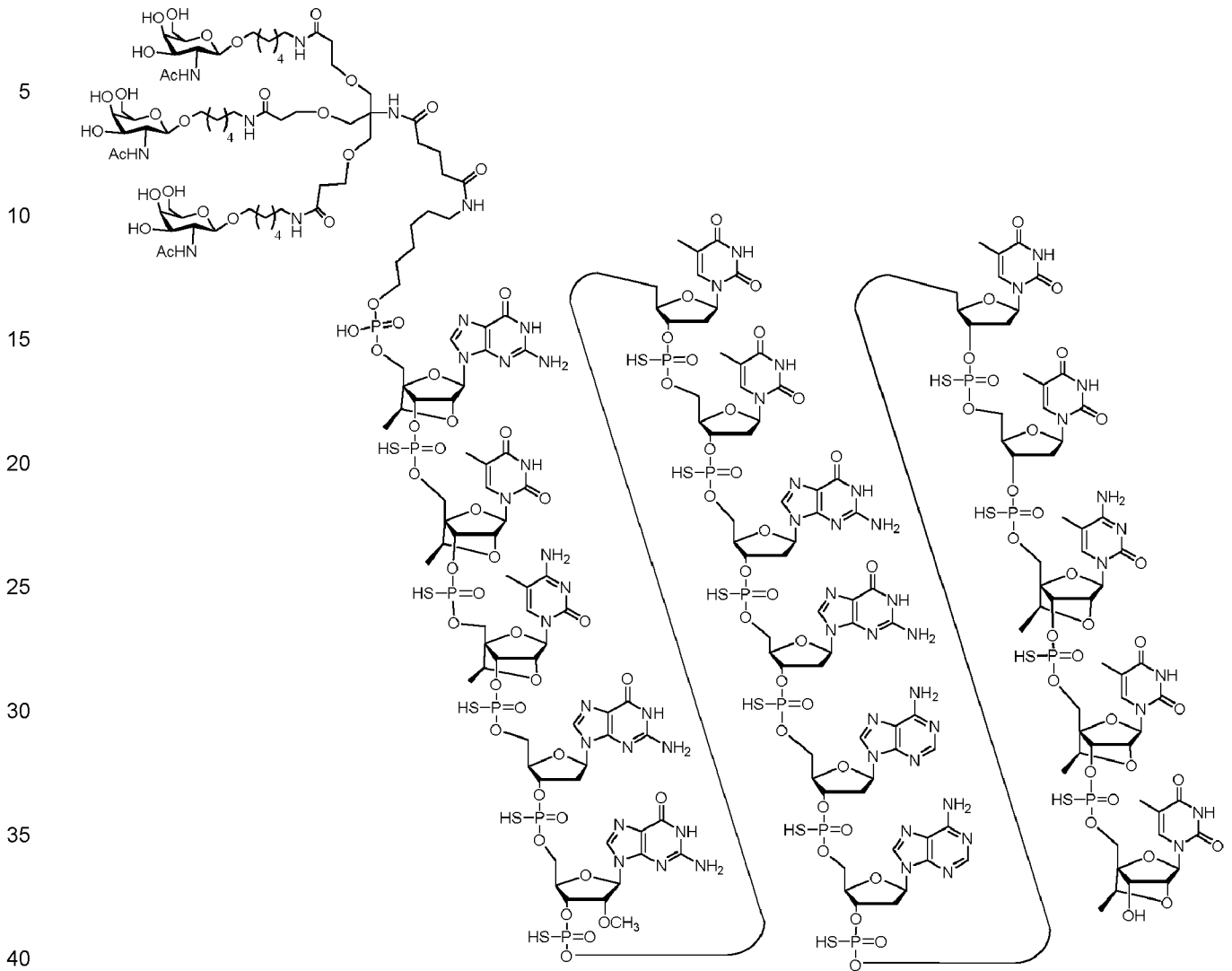
45

50

55

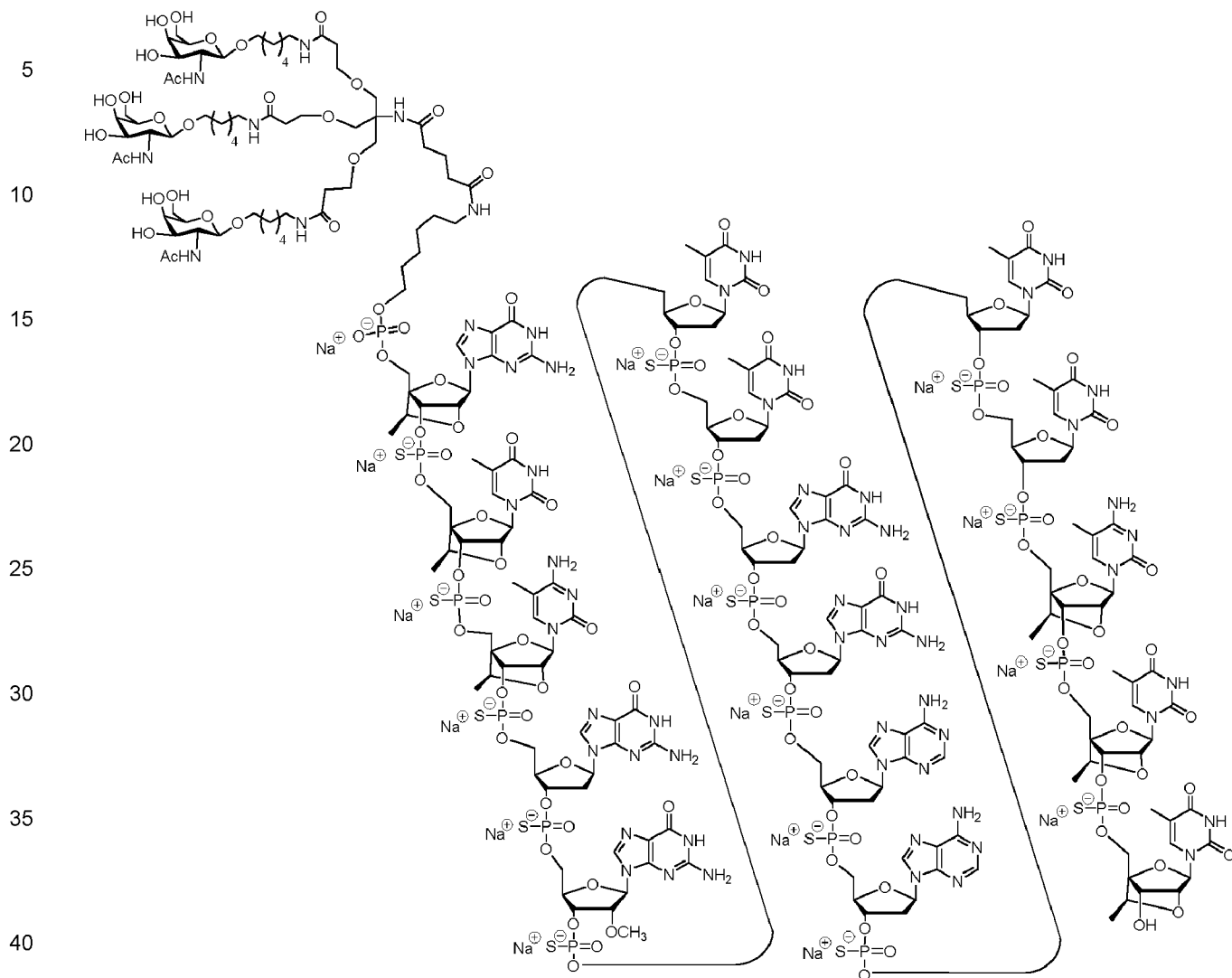
60

65



(SEQ ID N.º: 15) o una sal del mismo.

[0216] La sal sódica del Compuesto N.º 1250837 puede estar representada por la siguiente estructura química:



(SEQ ID N.º: 15).

45 **[0217]** El compuesto N.º 1250837 puede estar en forma aniónica.

4. Compuesto N.º 1250851

50 **[0218]** El compuesto N.º 1250851 puede caracterizarse como un *gapmer* 3-10-3 conjugado en el extremo 5' con un grupo conjugado. El compuesto 1250851 tiene una secuencia (de 5' a 3') de TCGGUTGGAATTCTTT (SEQ ID N.º: 14), en el que los nucleósidos 1-3 y 14-16 tienen modificaciones del azúcar cEt, en el que el nucleósido 5 tiene un azúcar ribosa 2'-OMe, y en el que cada uno de los nucleósidos 4 y 6-13 son 2'-β-D-desoxinucleósidos; donde los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 2 a 3, 3 a 4, y 14 a 15 son enlaces internucleósidos fosfodiéster y los enlaces internucleósidos entre los nucleósidos 1 a 2, 4 a 5, 5 a 6, 6 a 7, 7 a 8, 8 a 9, 9 a 10, 10 a 11, 11 a 12, 12 a 13, 13 a 14, y 15 a 16 son enlaces internucleósidos fosforotioato, y donde cada citosina es una 5-metil citosina. El compuesto N.º 1250851 tiene una protección terminal 5'-trihexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃, representada por la estructura siguiente, en la que el grupo fosfato está unido al átomo 5'-oxígeno del 5'-nucleósido:

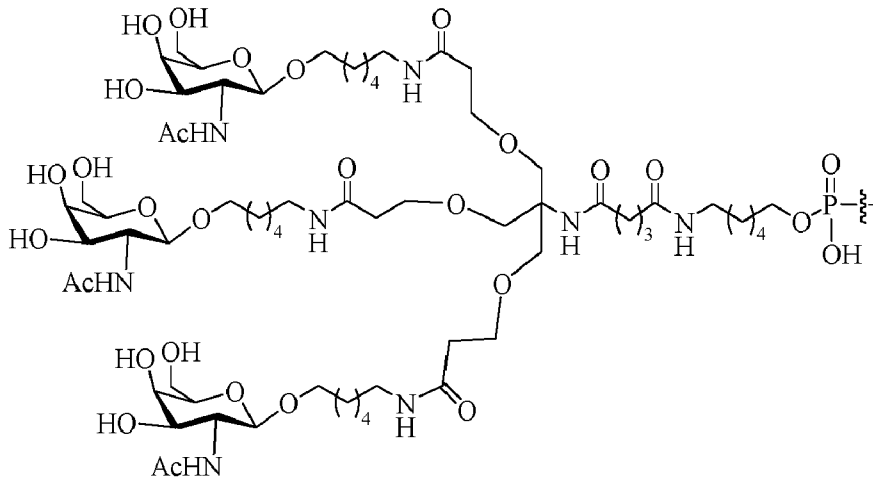
60

65

5

10

15



20

[0219] El compuesto N.º 1250851 puede representarse mediante la siguiente notación química: THA-C6-GalNAc₃-T_{ks}^mC_{ko}G_{ko}G_{ds}U_{ys}T_{ds}G_{ds}G_{ds}A_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}^mC_{ds}T_{ko}T_{ks}T_k (SEQ ID N.º: 14), en la que:

25

- A = una nucleobase de adenina,
- ^mC = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- U = una nucleobase uracilo,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- y = una fracción de azúcar ribosa 2'-OMe,
- s = un enlace internucleósido fosforotioato, y
- o = un enlace fosfodiéster internucleósido.

30

35

[0220] El compuesto N.º 1250851 puede estar representado por la siguiente estructura química:

40

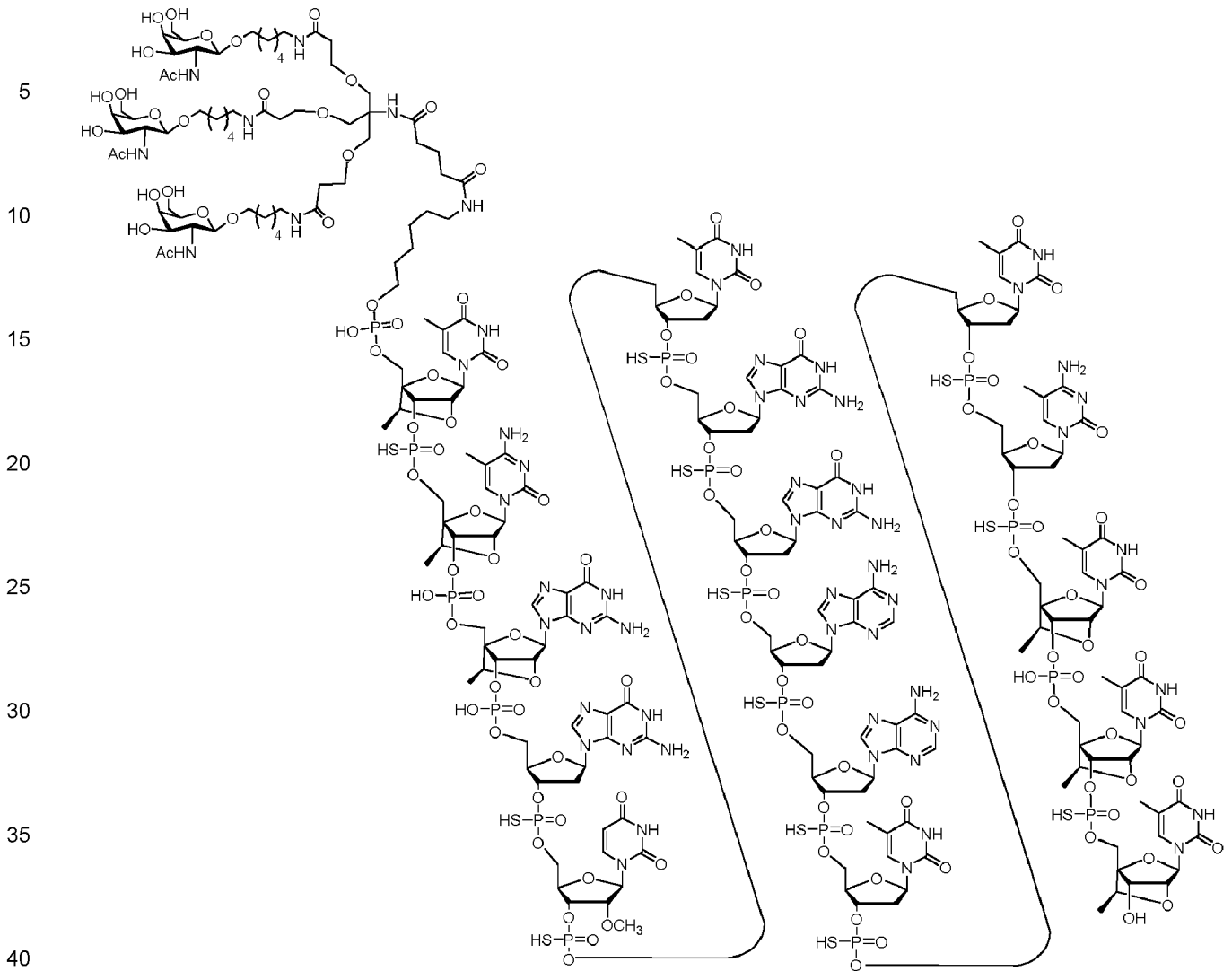
45

50

55

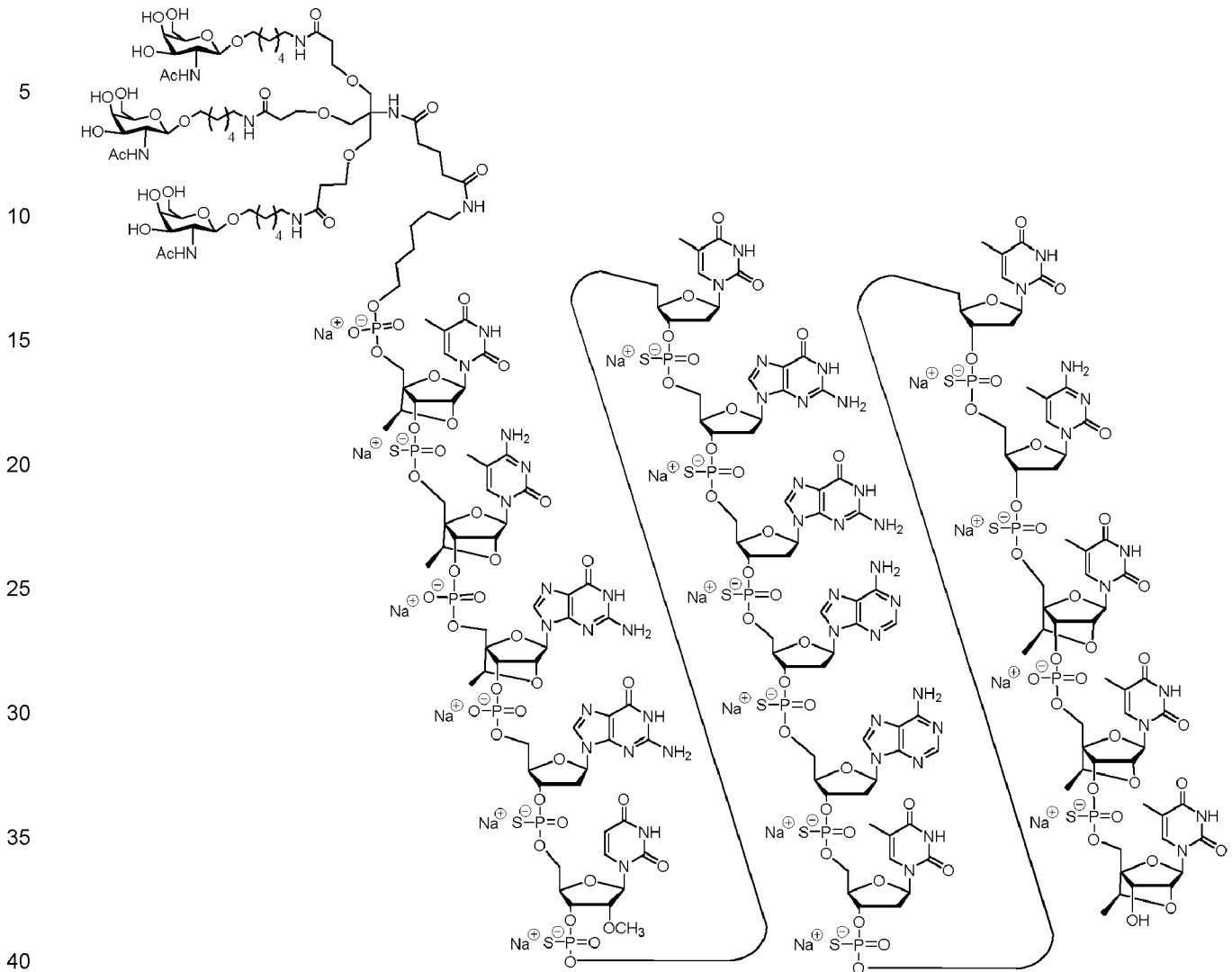
60

65



(SEQ ID N.º: 14) o una sal del mismo.

[0221] La sal sódica del Compuesto N.º 1250851 puede estar representada por la siguiente estructura química:

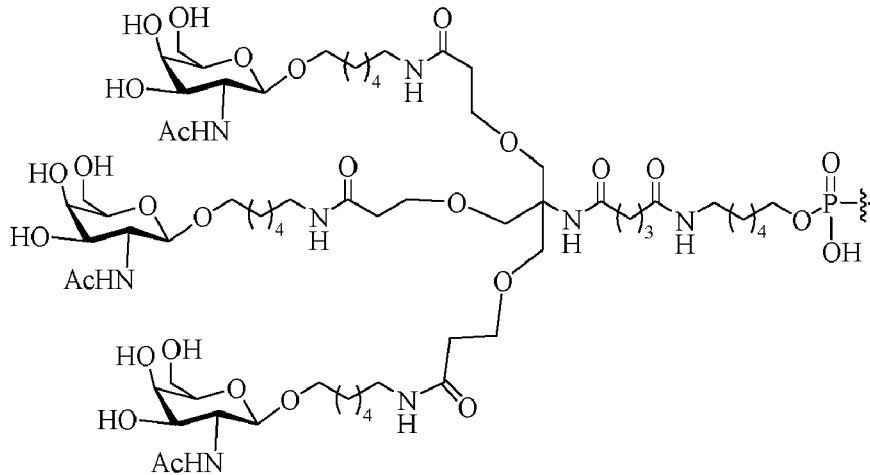


(SEQ ID N.º: 14).

[0222] El compuesto N.º 1250851 puede estar en forma aniónica.

VI. Ciertas composiciones de comparación

[0223] En ciertas realizaciones, el Compuesto N.º 757456 es un compuesto comparador. El compuesto N.º 757456 se describió previamente en el documento WO2017062816, y tiene una secuencia (de 5' a 3') de CACAAACAAGCTGGTCGGTT (SEQ ID N.º: 28), en el que el compuesto comprende un grupo conjugado y un oligonucleótido modificado; en el que el oligonucleótido modificado es un *gapmer* 5-10-5 MOE, en el que el segmento espacio central consta de diez 2'-β-D-desoxinucleósidos y los segmentos alares 5' y 3' constan cada uno de cinco nucleósidos modificados 2'-MOE. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas. El compuesto N.º 757456 tiene una protección terminal 5'-trishexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃, representada por la estructura siguiente, en la que el grupo fosfato está unido al átomo 5'-oxígeno del 5'-nucleósido:



[0224] En ciertas realizaciones, el Compuesto N.º 568637 es un compuesto comparador. El compuesto N.º 568637 se describió previamente en el documento WO2017062816, y tiene una secuencia (de 5' a 3') de CGCTGATTTGTCCGGG (SEQ ID N.º: 12), en el que el compuesto consiste en un oligonucleótido modificado; en el que el oligonucleótido modificado tiene 16 nucleósidos de longitud con restos de azúcares mezclados, según se describe por el motivo de azúcar eekdddddddddkkke; en el que cada "d" representa un resto de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, cada "e" representa un resto de azúcar 2'-MOE, y cada "k" representa un resto de azúcar cEt. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas.

[0225] En ciertas realizaciones, el Compuesto N.º 1176644 es un compuesto de comparación. El compuesto n.º 1176644 es el compuesto n.º 568637 que tiene una protección terminal 5'-trishexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃. El compuesto N.º 1176644, similar al compuesto N.º 568637, tiene una secuencia (de 5' a 3') de CGCTGATTTGTCCGGG (SEQ ID N.º: 12), en el que el compuesto comprende un oligonucleótido modificado; en el que el oligonucleótido modificado tiene 16 nucleósidos de longitud con fracciones de azúcar mezcladas, según se describe por el motivo de azúcar eekdddddddddkkke; en el que cada "d" representa una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, cada "e" representa una fracción de azúcar 2'-MOE, y cada "k" representa una fracción de azúcar cEt. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas.

[0226] En ciertas realizaciones, los compuestos aquí descritos son superiores en relación con los compuestos descritos en el documento WO2017062816 porque demuestran una o más propiedades mejoradas, como la potencia.

[0227] Por ejemplo, el Compuesto N.º 1205407 demostró una potencia mejorada *in vivo* en comparación con el Compuesto No. 757456. Como se muestra en el Ejemplo 5, el Compuesto N.º 1205407 logró una inhibición del 93% y del 90% del ARN y la proteína AGT, respectivamente, a una dosis de 2,7 mg/kg. En comparación, el compuesto N.º 757456 logró una inhibición del ARN y la proteína AGT del 65% y el 60%, respectivamente, a una dosis de 3,3 mg/kg. Por lo tanto, el Compuesto N.º 1205407 es más potente que el Compuesto N.º 757456 en este ensayo. Por ejemplo, como se muestra en el Estudio 1 del Ejemplo 6, el Compuesto N.º 1205407 alcanzó una ED₅₀ de 0,1 en el hígado y el plasma. En comparación, el compuesto N.º 757456 alcanzó una ED₅₀ de 1,3 en el hígado y el plasma. Por lo tanto, el Compuesto N.º 1205407 es más potente que el Compuesto N.º 757456 en este ensayo.

[0228] Por ejemplo, el Compuesto N.º 1205407 demostró una potencia *ex vivo* mejorada en comparación con el Compuesto N.º 757456. Como se muestra en el Ejemplo 8, el Compuesto N.º 1205407 alcanzó una IC₅₀ de 0,04 nM *ex vivo* utilizando el sistema Hepatopac. En comparación, el compuesto N.º 757456 tenía una IC₅₀ de >20 μM *ex vivo*. Por lo tanto, el Compuesto N.º 1205407 es más potente que el Compuesto N.º 757456 en este ensayo.

[0229] Por ejemplo, el Compuesto N.º 1205407 demostró una potencia mejorada *in vitro* en comparación con el Compuesto No. 757456 o el Compuesto No. 1176644. Como se muestra en el Ejemplo 7, el Compuesto N.º 1205407 alcanzó una IC₅₀ de 8 nM y 12 nM cuando se ensayó con dos conjuntos de sondas cebadoras diferentes *in vitro*. En comparación, el compuesto N.º 757456 alcanzó una IC₅₀ de 868 nM y 709 nM en las mismas condiciones de cultivo *in vitro*. En comparación, el compuesto N.º 1176644 alcanzó una IC₅₀ de 35 nM y 43 nM en las mismas condiciones de cultivo *in vitro*. Por lo tanto, el Compuesto N.º 1205407 es más potente que el Compuesto N.º 757456 o el Compuesto N.º 1176644 en este ensayo.

[0230] Por ejemplo, el Compuesto N.º 1205407 demostró una potencia mejorada *in vivo* en comparación con el Compuesto N.º 757456 o el Compuesto N.º 1176644. Como se muestra en el Estudio 2 del Ejemplo 6, el Compuesto N.º 1205407 alcanzó una ED₅₀ de 0,11 y una ED₇₅ de 0,38 en un estudio con ratones transgénicos. En comparación, el compuesto N.º 757456 alcanzó una ED₅₀ de 2,1 y una ED₇₅ de 2,68. En comparación, el compuesto N.º 1176644 alcanzó

una ED₅₀ de 0,38 y una ED₇₅ de 0,61. Por lo tanto, el Compuesto N.º 1205407 es más potente que el Compuesto N.º 757456 o el Compuesto N.º 1176644 en este ensayo.

Divulgación no limitativa

[0231] Aunque ciertos compuestos, composiciones y métodos descritos en el presente documento se han descrito con especificidad de acuerdo con ciertas realizaciones, los siguientes ejemplos sirven únicamente para ilustrar los compuestos descritos en el presente documento y no pretenden limitar los mismos.

[0232] Aunque el listado de secuencias que acompaña a esta presentación identifica cada secuencia como "ARN" o "ADN" según se requiera, en realidad, esas secuencias pueden modificarse con cualquier combinación de modificaciones químicas. Un experto en la técnica apreciará fácilmente que la designación como "ARN" o "ADN" para describir oligonucleótidos modificados es, en ciertos casos, arbitraria. Por ejemplo, un oligonucleótido que comprende un nucleósido con una fracción de azúcar 2'-OH y una base de timina podría describirse como un ADN con una fracción de azúcar modificado (2'-OH en lugar de un 2'-H del ADN) o como un ARN con una base modificada (timina (uracilo metilado) en lugar de un uracilo del ARN). En consecuencia, las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento, incluyendo, pero sin limitarse a las del listado de secuencias, pretenden abarcar ácidos nucleicos que contengan cualquier combinación de ARN y/o ADN natural o modificado, incluyendo, pero sin limitarse a tales ácidos nucleicos que tengan nucleobases modificadas. A modo de ejemplo adicional y sin limitación, un compuesto oligomérico que tiene la secuencia de nucleobase "ATCGATCG" abarca cualquier compuesto oligomérico que tiene dicha secuencia de nucleobase, ya sea modificada o no modificada, incluyendo, pero sin limitarse a, dichos compuestos que comprenden bases de ARN, tales como los que tienen la secuencia "AUCGAUCG" y los que tienen algunas bases de ADN y algunas bases de ARN, tales como "AUCGATCG" y compuestos oligoméricos que tienen otras nucleobases modificadas, tales como "AT^mCGAUCG", donde ^mC indica una base de citosina que comprende un grupo metilo en la posición 5.

[0233] Ciertos compuestos descritos en el presente documento (por ejemplo, oligonucleótidos modificados) tienen uno o más centros asimétricos y, por lo tanto, dan lugar a enantiómeros, diastereómeros y otras configuraciones estereoisoméricas que pueden definirse, en términos de estereoquímica absoluta, como (R) o (S), como α o β como para anómeros de azúcar, o como (D) o (L), como para aminoácidos, etc. Los compuestos proporcionados en el presente documento que se dibujan o describen como poseedores de ciertas configuraciones estereoisoméricas incluyen únicamente los compuestos indicados. Los compuestos proporcionados en el presente documento que se dibujan o describen con estereoquímica indefinida incluyen todos los isómeros posibles, incluidas sus formas estereorándomicas y ópticamente puras, a menos que se especifique lo contrario. Asimismo, se incluyen todos los isómeros cis y trans y las formas tautoméricas de los compuestos aquí incluidos, a menos que se indique lo contrario. Los compuestos oligoméricos aquí descritos incluyen mezclas quirales puras o enriquecidas, así como mezclas racémicas. Por ejemplo, los compuestos oligoméricos que tienen una pluralidad de enlaces internucleósidos de fosforotioato están controlada o es aleatoria. A menos que se indique lo contrario, los compuestos descritos en el presente documento pretenden incluir las formas salinas correspondientes.

[0234] Los compuestos aquí descritos incluyen variaciones en las que uno o más átomos se sustituyen por un isótopo no radiactivo o un isótopo radiactivo del elemento indicado. Por ejemplo, los compuestos del presente documento que comprenden átomos de hidrógeno abarcan todas las posibles sustituciones de deuterio para cada uno de los átomos de hidrógeno ¹H. Las sustituciones isotópicas incluidas en los compuestos del presente documento son, entre otras, las siguientes: ²H o ³H en lugar de ¹H, ¹³C o ¹⁴C en lugar de ¹²C, ¹⁵N en lugar de ¹⁴N, ¹⁷O o ¹⁸O en lugar de ¹⁶O, y ³³S, ³⁴S, ³⁵S, o ³⁶S en lugar de ³²S. En ciertas realizaciones, las sustituciones isotópicas no radiactivas pueden conferir nuevas propiedades al compuesto oligomérico que son beneficiosas para su uso como herramienta terapéutica o de investigación. En ciertas realizaciones, las sustituciones isotópicas radiactivas pueden hacer que el compuesto sea adecuado para fines de investigación o diagnóstico, como la obtención de imágenes.

EJEMPLOS

[0235] Los siguientes ejemplos ilustran ciertas realizaciones de la presente divulgación y no son limitativos. Además, cuando se proporcionan realizaciones específicas, los inventores han contemplado la aplicación genérica de dichas realizaciones específicas.

Ejemplo 1: Diseño de oligonucleótidos modificados complementarios de un ácido nucleico AGT humano

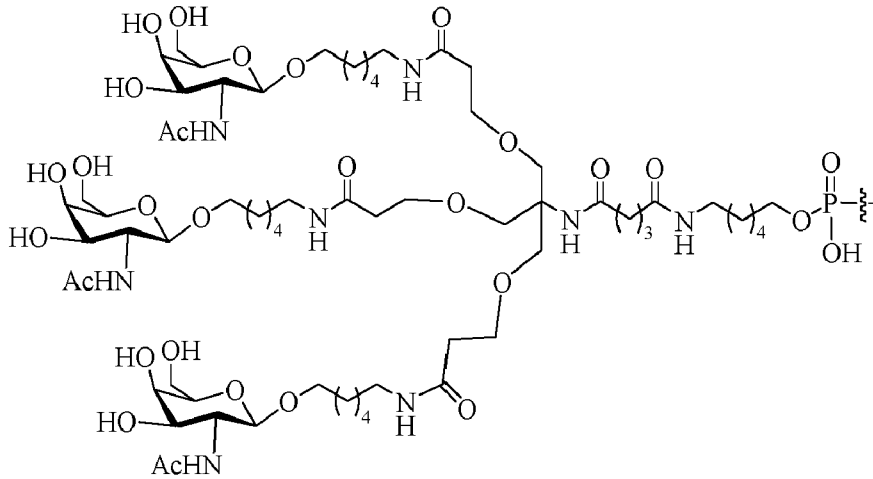
[0236] Se diseñaron oligonucleótidos modificados complementarios a un ácido nucleico AGT humano, como se describe en las tablas siguientes. "Sitio de inicio" en todas las tablas siguientes indica el nucleósido más 5' al que el oligonucleótido modificado es complementario en la secuencia del ácido nucleico diana. "Sitio de parada" indica el nucleósido más 3' al que el oligonucleótido modificado es complementario en la secuencia de ácido nucleico diana. Cada oligonucleótido modificado enumerado en las tablas siguientes es 100% complementario a SEQ ID N.º: 1 (Adhesión GENBANK N.º NM_000029.3), o a SEQ ID N.º: 2 (el complemento de Adhesión GENBANK N.º NC_000001.11 truncado de los nucleótidos 230700001 a 230718000), o a ambos.

[0237] El oligonucleótido modificado de la Tabla 1 tiene 16 nucleósidos de longitud con motivos de azúcar mezclados como se indica en la tabla siguiente, en la que cada `d' representa un motivo de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, cada `e' representa un motivo de azúcar 2'- MOE, y cada `k' representa un motivo de azúcar cEt. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas. El 568637 es un compuesto de comparación descrito previamente en el documento WO 2017/062816.

Tabla 1
Gapmers 3-10-3 MOE/cEt de ala mixta con enlaces internucleósidos PS uniformes complementarios al ARN de AGT humana

Gapmers 3-10-3 MOE/cEt ala mixta c/ enlaces internucleósidos PS uniformes complement. al ARN de AGT humana							
ID del Compuesto	SEQ ID NO: 1 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 1 Sitio Dete.	SEQ ID NO: 2 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 2 Sitio Dete	Secuencia (5' to 3')	Motivo de azúcar (5' a 3')	SEQ ID NO
568637	2046	2061	14940	14955	CGCTGATTTGTCCGGG	eekdddddddddkke	12

[0238] Todos los oligonucleótidos modificados de las Tablas 2-6 tienen una protección terminal 5'-trishexilamino-(THA)-C₆GalNAc₃, representada por la siguiente estructura, en la que el grupo fosfato está unido al átomo de 5'-oxígeno del 5'-nucleósido:



[0239] Los oligonucleótidos modificados de la Tabla 2 tienen una longitud de 16 nucleósidos con motivos de azúcar mezclados como se indica, donde cada "d" representa un motivo de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, cada "e" representa un motivo de azúcar 2'- MOE, y cada "k" se refiere a un motivo de azúcar cEt. El motivo internucleósido para los *gapmers* es (de 5' a 3'): soosssssssssssssos; donde cada 'o' representa un enlace internucleósido fosfodiéster y cada 's' representa un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 2

Capmers 3-10-3 MOE/cEt ala mixta conjugados con GalNAc c/ enlaces internucleosidos PO/PS uniformes complement. al ARN de AGT humana							
ID del Compuesto	SEQ ID NO: 1 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 1 Sitio Detenc.	SEQ ID NO: 2 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 2 Sitio Detenc.	Secuencia (5' a 3')	Mot. azucar (5' a 3')	SEQ ID NO
1205407	2046	2061	14940	14955	THA-GalNAc- CCCTGATTGTCGGG	eekdddddiddiddkke	12
1205408	2271	2286	15165	15180	THA-GalNAc- TCGGTTGGAATCTTT	ekdddddiddiddkke	13
1205410	2046	2061	14940	14955	THA-GalNAc- CCCTGATTGTCGGG	ekdddddiddiddkke	12

[0240] Los oligonucleótidos modificados de la Tabla 3 tienen 16 nucleósidos de longitud con restos de azúcares mezclados como se indica, donde cada "d" representa un resto de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, cada "e" representa un resto de azúcar 2'- MOE, cada "k" se refiere a un resto de azúcar cEt, y cada "y" se refiere a un azúcar ribosa 2'-OMe. El motivo internucleósido para los *gapmers* es (de 5' a 3'): soosssssssssssssos; donde cada 'o' representa un enlace internucleósido fosfodiéster y cada 's' representa un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas, a menos que se indique con una 'C' subrayada en negrita, en cuyo caso, la citosina no está metilada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 3

Gp ₁ y ₂ 3-10-3 MOE/cEt conjugados con GalNAc que tienen un 2'-OMe en el espacio c/ enlaces internucleósidos PO/PS mixtos complement. al ARN de AGT humana							
ID del Compuesto	SEQ ID NO: 1 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 1 Sitio Dete.	SEQ ID NO: 2 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 2 Sitio Dete.	Secuencia (5' a 3')	Mot. azúcar (5' a 3')	SEQ ID NO
1259239	637	652	7279	7294	THA-GalNAc- CTCATUGTGATGACG	kkkdydddddakkk	16
1259240	637	652	7279	7294	THA-GalNAc- CTCATUGTGATGACG	kkkdddydddddakkk	17
1259247	711	726	7353	7368	THA-GalNAc- TGAATUGGAGCAGGTA	kkkdydddddakkk	18
1259248	711	726	7353	7368	THA-GalNAc- TGAATUGGAGCAGGTA	kkkdddydddddakkk	19
1251199	785	800	7427	7442	THA-GalNAc- CGGTGCAAGTTTTC	kkkdydddddakkk	20
1251204	1828	1841	14720	14735	THA-GalNAc- GTTGGTAGACTCTGT	kkkdydddddakkk	21
1250850	2046	2061	14940	14955	THA-GalNAc- CCCTGATTGTCCGGG	kkkdydddddakkk	12
1251213	2258	2263	15162	15177	THA-GalNAc- GTTGGAATCTTTTIG	kkkdydddddakkk	22
1250851	2271	2286	15186	15180	THA-GalNAc- TCGGUTGGAAATCTTT	kkkdydddddakkk	14

[0241] Los oligonucleótidos modificados de la Tabla 4 tienen 16 nucleósidos de longitud con motivos de azúcares mixtos como se indica, donde "d" representa una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, "e" representa una fracción de azúcar 2'-MOE, y "k" se refiere a una fracción de azúcar cEt. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 4

Gapmers 3-10-3 MOE/cEt de ala mixta conjugados con GalNAc c/ enlaces internucleosidos PS uniformes complement. al ARN de AGT humana							
ID del Compuesto	SEQ ID NO: 1 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 1 Sitio Defen.	SEQ ID NO: 2 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 2 Sitio Defen.	Secuencia (5' a 3')	Mat. azúcar (5' a 3')	SEQ ID NO
1176644	2046	2061	14940	14955	THA-GalNAc- CGCTGATTGTCGGG	eeekdddddiddddkke	12
1176648	2271	2286	15166	15180	THA-GalNAc- TCGGTTGGAAATTCCTT	ekkkdddddiddddkke	13
1176649	2272	2287	15166	15181	THA-GalNAc- GTCCGTTGGAAATTCCTT	ekkkdddddiddddkke	15
1176653	2046	2061	14940	14955	THA-GalNAc- CGCTGATTGTCGGG	ekkkdddddiddddkke	12
1231463	1834	1849	14720	14743	THA-GalNAc- GTTAACCTGTTGGGTA	kkkkdddddiddddkke	23

[0242] Los oligonucleótidos modificados de la Tabla 5 tienen 16 nucleósidos de longitud con motivos de azúcares mixtos como se indica, donde "d" representa una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil, "e" representa una fracción de azúcar 2'-MOE, "k" se refiere a una fracción de azúcar cEt, e "y" se refiere a un azúcar ribosa 2'-OMe. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas, a menos que se indique con una 'C' subrayada en negrita, en cuyo caso, la citosina no está metilada.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 5

Gamers 3-10-3 cEt conjugados con GalNAc que tienen un 2'-OMe en el espacio c/ enlaces internucleósidos PS uniformes complement. al ARN de AGT humana							
ID del Compuesto	SEQ ID NO: 1 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 1 Sitio Deten.	SEQ ID NO: 2 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 2 Sitio Deten.	Secuencia (5' a 3')	Mot. azúcar(5' a 3')	SEQ ID NO
1250835	2046	2061	14940	14955	THA-GalNAc- CGCTGATTTGTCGGG	kkkdydddddakkk	12
1250836	2271	2286	15165	15180	THA-GalNAc- TCGGUTGGAATTC TT	kkkdydddddakkk	14
1250837	2272	2287	15166	15181	THA-GalNAc- CTCCGTTGGAATTC TT	kkkdydddddakkk	15
1250840	711	726	7353	7368	THA-GalNAc- TGAAUTGGAGCCAGGTA	kkkdydddddakkk	24
1250842	1729	1744	13760	13775	THA-GalNAc- TTGCAGGTTCAAGCTCG	kkkdydddddakkk	25
1251216	1822	1837	14716	14731	THA-GalNAc- GGTAGACTCTGTGGCC	kkkdydddddakkk	26
1251228	2268	2283	15162	15177	THA-GalNAc- GTTGGAATTC TT TTG	kkkdydddddakkk	27

[0243] El oligonucleótido modificado de la Tabla 6 es un *gapmer* 5-10-5 MOE con enlaces internucleósidos uniformes de fosforotioato. El compuesto tiene una longitud de 20 nucleósidos, en los que el segmento de espacio central está formado por diez 2'- β -D-desoxinucleósidos y los segmentos de las alas 5' y 3' están formados cada uno por cinco nucleósidos modificados con 2'-MOE. Cada enlace internucleósido es un enlace internucleósido fosforotioato. Todos los residuos de citosina son 5-metilcitosinas. 757456 es un compuesto de comparación descrito previamente en el documento WO 2017/062816.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 6

Gapmers 5-10-5 MOE/cEt conjugados con GalNAc o/ enlaces internucleósidos PS uniformes complement. al ARN de AGT humana							
ID del Compuesto	SEQ ID NO: 1 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 1 Sitio Det.	SEQ ID NO: 2 Sitio Inicio	SEQ ID NO: 2 Sitio Det.	Secuencia (5' a 3')	Mot. Azúcar (5' a 3')	SEQ ID NO
757456	2281	2300	15175	15194	THA-GalNAc- CACAAACAAGCTGGTCGGTT	eeeeeeeeeeeeeeee	28

Ejemplo 2: Inhibición de AGT humana *in vitro* dependiente de la dosis en células HepG2

[0244] Células HepG2 cultivadas a una densidad de 10.000 células por pocillo tratadas por electroporación con oligonucleótidos modificados diluidos a diferentes concentraciones según se especifica en las tablas siguientes. Tras un periodo de tratamiento de aproximadamente 24 horas, se midieron los niveles de ARN de AGT como se ha descrito anteriormente, utilizando el conjunto de cebadores-sonda de AGT humana RTS3721 (descrito anteriormente). Los niveles de ARN de AGT se normalizaron con respecto al nivel de expresión de GAPDH humana utilizando el conjunto de sondas de cebado RTS104 (secuencia directa GAAGGTGAAGGTCGGAGTC, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 9; secuencia inversa GAAGATGGTATGGGATTTTC, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 10; secuencia de sonda CAAGCTTCCCCTTCTCAGCC, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 11). Los resultados se presentan en las tablas siguientes como porcentaje de inhibición de AGT, en relación con las células de control no tratadas. Tal como se utiliza en el presente documento, un valor "0" indica que el tratamiento con el oligonucleótido modificado no inhibió los niveles de ARNm de AGT.

Tabla 7

Ensayo multidosis de oligonucleótidos modificados en células HepG2

N.º de compuesto	% de inhibición					IC ₅₀ (µM)
	23 nM	94 nM	375 nM	1500 nM	6000 nM	
1250840	0	0	5	25	51	5.3
1231463	0	8	14	47	77	1.8
1205407	0	19	52	81	91	0.4
1250850	12	25	49	74	93	0.4
1251213	0	6	3	33	71	2.8
1251228	0	0	4	34	58	3.9
1205408	3	5	15	47	77	1.8
1250836	0	9	22	48	75	1.7
1250851	11	7	24	61	80	1.1
1250837	11	4	29	61	83	1.0
1299239	13	37	65	92	97	0.8
1299240	23	56	85	97	96	1.9
1205410	6	16	31	68	98	0.2
1250835	10	20	50	87	86	0.4

Ejemplo 3: Tolerabilidad de oligonucleótidos modificados dirigidos contra AGT humana en ratones CD-1

[0245] Los ratones CD1 son un modelo de ratón polivalente utilizado frecuentemente para pruebas de seguridad y eficacia. Se trató a los ratones con oligonucleótidos modificados seleccionados de los estudios descritos anteriormente y se evaluaron los cambios en los niveles de varios marcadores químicos plasmáticos.

Tratamiento

[0246] Grupos de ratones CD-1 machos de 6 a 8 semanas de edad fueron inyectados por vía subcutánea una vez por semana durante seis semanas (para un total de 7 tratamientos) con 15 mg/kg de oligonucleótidos modificados. A un grupo de ratones CD-1 macho se le inyectó solución salina. Los ratones fueron eutanasiados 72 horas después de la última administración.

Marcadores químicos plasmáticos

[0247] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos modificados sobre la función hepática, se midieron los niveles

plasmáticos de nitrógeno ureico en sangre (BUN), albúmina, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatinina (CREA) y bilirrubina total (TBIL) utilizando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400c, Melville, NY). Los resultados se presentan en la tabla siguiente.

5

Tabla 8

Marcadores de química plasmática en ratones CD-1 macho

10

N.º de compuesto	BUN (mg/dL)	Albúmina (g/dL)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)	CREA (mg/dL)
Solución salina	23	3	31	49	0.14	0.08
1175644	24	3	52	56	0.13	0.11
1175648	25	3	70	51	0.12	0.11
1175653	22	3	309	330	0.12	0.09
1205407	21	3	123	83	0.12	0.09
1205408	24	3	64	78	0.12	0.13
1205410	26	3	161	121	0.13	0.11
1231463	27	3	132	188	0.19	0.13

15

20

25

30

35

[0248] La sangre obtenida de los grupos de ratones en la semana 6 se envió a IDEXX BioResearch para medir el recuento de células sanguíneas. Los recuentos realizados incluyen el recuento de glóbulos rojos (RBC), el recuento de glóbulos blancos (WBC), la hemoglobina (HGB), el hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) y los recuentos individuales de glóbulos blancos, como el de monocitos (MON), neutrófilos (NEU), linfocitos (LYM) y plaquetas (PLT). Los resultados se presentan en las tablas siguientes.

40

45

50

55

60

65

Tabla 9

Recuento de células sanguíneas en ratones CD-1 macho												
Compuesto No.	WBC (K/uL)	RBC (M/uL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	NEU (uL)	LYM (uL)	MON (uL)	PLT (K/uL)	
Saline	8	9	14	47	52	16	31	1133	6142	390	1290	
1176844	6	9	14	46	50	16	31	919	4533	231	1182	
1176848	4	8	14	44	50	16	31	703	3270	227	1186	
1176853	8	10	15	48	48	15	32	989	6505	361	829	
1203407	9	10	15	47	47	15	33	901	7171	355	1228	
1203408	9	9	15	46	48	15	32	1633	6746	501	1446	
1203410	6	9	14	45	50	16	32	714	5112	227	994	
1231453	8	10	15	46	48	16	32	872	6365	481	1260	

[0249] Se midió el peso corporal de los ratones en los días 1 y 35, y el peso corporal medio de cada grupo se presenta en la tabla siguiente. Los pesos del hígado, el bazo y los riñones se midieron al final del estudio y se presentan en la tabla siguiente. Los oligonucleótidos modificados que provocaron cambios en el peso de los órganos fuera del intervalo esperado para los oligonucleótidos modificados se excluyeron de los estudios posteriores.

Tabla 10

Pesos corporales y de órganos (g)

N.º de compuesto	Peso corporal (g)		Peso del hígado (g)	Peso del riñón (g)	Peso del bazo (g)
	Día 1	Día 35			
PBS	31.7	37.7	2.1	0.7	0.2
1176644	31.0	37.7	2.5	0.5	0.1
1176648	32.4	40.0	2.5	0.6	0.1
1176653	32.0	40.7	2.8	0.7	0.1
1205407	31.7	39.2	2.7	0.6	0.1
1205408	30.5	38.3	2.2	0.5	0.1
1205410	29.8	35.2	2.4	0.5	0.1
1231463	32.5	39.6	2.5	0.5	0.1

Ejemplo 4: Tolerabilidad de oligonucleótidos modificados dirigidos a la AGT humana en ratas Sprague-Dawley

[0250] Las ratas Sprague-Dawley son un modelo polivalente utilizado para evaluaciones de seguridad y eficacia. Las ratas fueron tratadas con los oligonucleótidos modificados de lonis de los estudios descritos en los Ejemplos anteriores y se evaluaron los cambios en los niveles de varios marcadores químicos plasmáticos.

ESTUDIO 1*Tratamiento*

[0251] Las ratas macho Sprague-Dawley se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con pienso Purina normal para ratas. Grupos de 4 ratas Sprague-Dawley cada uno fueron inyectados semanalmente por vía subcutánea con 15 mg/kg de oligonucleótido lonis durante 6 semanas (total 6 dosis). 72 horas después de la última dosis, se practicó la eutanasia a las ratas y se recogieron órganos, orina y plasma para su posterior análisis.

Marcadores químicos plasmáticos

[0252] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos de lonis sobre la función hepática, se midieron los niveles plasmáticos de transaminasas utilizando un analizador de química clínica automatizado (Hitachi Olympus AU400c, Melville, NY). Se midieron los niveles plasmáticos de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la tabla siguiente expresados en UI/L. Los niveles plasmáticos de bilirrubina total (TBIL), creatinina, albúmina y nitrógeno ureico en sangre (BUN) también se midieron con el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 11

Marcadores de química plasmática en ratas Sprague-Dawley

N.º de compuesto	BUN (mg/dL)	Albúmina (g/dL)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)	CREA (mg/dL)
Solución salina	17	3	27	78	0.13	0.23
1205407	15	3	69	182	0.15	0.25
1205408	20	3	34	151	0.36	0.25

Pesos de los órganos

[0253] Los pesos del hígado, corazón, bazo y riñón se midieron al final del estudio y se presentan en la Tabla a continuación.

Tabla 12

Pesos de órganos (g)

N.º de compuesto	Hígado (g)	Riñón (g)	Bazo (g)
Solución salina	13.7	3.4	0.8
1205407	15.2	3.6	1.2
1205408	18.3	4.0	1.2

Función renal

[0254] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos modificados por Ionis sobre la función renal, se midieron los niveles urinarios de proteína total y creatinina utilizando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400c, Melville, NY). En la tabla siguiente se presentan las relaciones entre proteínas totales y creatinina (relación P/C).

Tabla 13

Proporción de proteína total a creatinina en ratas Sprague-Dawley

N.º de compuesto	Proporción P/C
Solución salina	1.1
1205407	2.1
1205408	0.7

Estudio 2
Tratamiento

[0255] Las ratas macho Sprague-Dawley se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y se alimentaron *ad libitum* con pienso Purina normal para ratas. Grupos de 4 ratas Sprague-Dawley cada uno fueron inyectados semanalmente por vía subcutánea con 15 mg/kg de oligonucleótido lonis durante 6 semanas (total 6 dosis). 72 horas después de la última dosis, se practicó la eutanasia a las ratas y se recogieron órganos, orina y plasma para su posterior análisis.

Marcadores químicos plasmáticos

[0256] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos de lonis sobre la función hepática, se midieron los niveles plasmáticos de transaminasas utilizando un analizador de química clínica automatizado (Hitachi Olympus AU400c, Melville, NY). Se midieron los niveles plasmáticos de ALT (alanina transaminasa) y AST (aspartato transaminasa) y los resultados se presentan en la tabla siguiente expresados en UI/L. Los niveles plasmáticos de bilirrubina total (TBIL), creatinina, albúmina y nitrógeno ureico en sangre (BUN) también se midieron con el mismo analizador de química clínica y los resultados también se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 14

Marcadores de química plasmática en ratas Sprague-Dawley

N.º de compuesto	BUN (mg/dL)	Albúmina (g/dL)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)	CREA (mg/dL)
Solución salina	16	3	28	112	0.11	0.27
1250837	18	4	32	129	0.14	0.23
1250851	18	3	119	641	0.41	0.25

Pesos de los órganos

[0257] Los pesos del hígado, corazón, bazo y riñón se midieron al final del estudio y se presentan en la Tabla a continuación.

Tabla 15

Pesos de órganos (g)

N.º de compuesto	Hígado (g)	Riñón (g)	Bazo (g)
Solución salina	12.242	3.388	1.051
1250837	13.771	3.580	1.184
1250851	14.850	3.756	1.166

Función renal

[0258] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos modificados por lonis sobre la función renal, se midieron los niveles urinarios de proteína total y creatinina utilizando un analizador químico clínico automatizado (Hitachi Olympus AU400c, Melville, NY). En la tabla siguiente se presentan las relaciones entre proteínas totales y creatinina (relación P/C).

Tabla 16

Proporción de proteína total a creatinina en ratas Sprague-Dawley

N.º de compuesto	Proporción P/C
Solución salina	0.9
1250837	1.1
1250851	0.8

Ejemplo 5: Actividad de oligonucleótidos modificados complementarios de AGT humana en ratones transgénicos

[0259] Se desarrolló un modelo de ratón transgénico AGT en el laboratorio de Dr. Curt Sigmund mediante la inserción de una construcción transgénica de 14 kb que contiene el gen del angiotensinógeno humano completo (aproximadamente 11,5 kb) y la secuencia flanqueante 5' (1,2 kb) y 3' (1,4 kb) (Yang G; et al. 1994. J Biol Chem 269(51):32497-502) y se utilizó para otros ensayos de los oligonucleótidos modificados descritos anteriormente.

Tratamiento

[0260] Los ratones transgénicos AGT se dividieron en grupos de 2 ratones cada uno. Cada ratón fue inyectado semanalmente por vía subcutánea con 2,7 mg/kg de oligonucleótidos modificados (un total de 2 dosis en los días 0 y 7). Un grupo de 2 ratones recibió solución salina como control negativo. Además, un grupo de 2 ratones recibió 3,3 mg/kg del oligonucleótido 757456 modificado de comparación (un total de 2 dosis en los días 0 y 7). Los ratones fueron sacrificados tres días después de la última dosis (día 10). Se recogieron muestras de hígado y plasma para su análisis.

Análisis de ARN y proteínas

[0261] Se extrajo ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real para medir la cantidad de ARN de AGT utilizando el conjunto de sonda de cebador humano RTS3721 (descrito anteriormente en el presente documento). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del ARN de AGT en relación con el control salino, normalizado al contenido total de ARN, medido por RIBOGREEN®. Además, se extrajo plasma para medir los niveles de proteína AGT humana en plasma mediante un kit ELISA (Human Total Angiotensinogen Assay Kit, IBL, Cat#27412). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la proteína AGT en relación con el control salino.

Tabla 17

Reducción de proteína y ARN de AGT humana en ratones transgénicos

N.º de compuesto	Dosis (mg/kg)	% de inhibición (ARN de AGT) en el hígado	% de inhibición (proteína AGT) en plasma
757456	3.3	65	60
1231463	2.7	93	87
1176644	2.7	90	91
1176648	2.7	93	90
1176653	2.7	96	93
1205407	2.7	93	90
1205408	2.7	94	91
1205410	2.7	96	92
1250842	2.7	88	65
1251204	2.7	44	47

Ejemplo 6: Potencia de oligonucleótidos modificados complementarios al ARN AGT humano en ratones transgénicos, dosis múltiple

[0262] Los oligonucleótidos modificados se probaron además de manera dependiente de la dosis en el modelo de ratón transgénico descrito anteriormente.

Tratamiento

[0263] Los ratones transgénicos AGT se dividieron en grupos de 2 ratones cada uno. A cada ratón se le inyectaron por vía subcutánea dos dosis (en los días 0 y 7) de oligonucleótido modificado a las concentraciones indicadas en la tabla siguiente. Un grupo de 4 ratones recibió PBS como control negativo. Setenta y dos horas después de la última dosis (día 10), se practicó la eutanasia a los ratones. Se recogieron muestras de hígado y plasma para su análisis. El compuesto N.º 757456 se añadió como compuesto de comparación en algunos estudios.

ESTUDIO 1*Análisis de ARN y proteínas*

[0264] Se extrajo ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real para medir la cantidad de ARN de AGT utilizando el conjunto de sonda de cebador humano RTS3721 (descrito anteriormente en el presente documento). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del ARN de AGT en relación con el control salino, normalizado al contenido total de ARN, medido por RIBOGREEN®. Además, se extrajo plasma para medir los niveles de proteína AGT humana en plasma mediante un kit ELISA (Human Total Angiotensinogen Assay Kit, IBL, Cat#27412). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la proteína AGT en relación con el control salino.

Tabla 18

Reducción (%) de proteína y ARN de AGT humana en ratones transgénicos

N.º de compuesto	Dosis (mg/kg)	% de inhibición (ARN de AGT) en el hígado	ED ₅₀ (mg/kg)	% de inhibición (proteína AGT) en plasma
757456	4.5	81	1.3	81
	1.5	41		49
	0.5	39		31
1205407	4.5	97	0.1	97
	1.5	95		94
	0.5	75		79
1205408	4.5	97	0.2	95
	1.5	91		90
	0.5	75		74
1205410	4.5	98	0.1	98
	1.5	97		96
	0.5	83		85
1231463	4.5	97	0.3	94
	1.5	90		87
	0.5	70		65
1250835	4.5	88	0.2	91
	1.5	86		84
	0.5	72		73
1250836	4.5	95	0.1	96
	1.5	93		93
	0.5	82		77

Estudio 2

Análisis de ARN y proteínas

[0265] Se extrajo ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real para medir la cantidad de ARN de AGT utilizando el conjunto de sonda de cebador humano RTS3721 (descrito anteriormente). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del ARN de AGT en relación con el control salino, normalizado al contenido total de ARN, medido por RIBOGREEN®. Además, se extrajo plasma para medir los niveles de proteína AGT humana en plasma mediante un kit ELISA (Human Total Angiotensinogen Assay Kit, IBL, Cat#27412). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la proteína AGT en relación con el control salino.

Tabla 19.

Reducción de proteína y ARN de AGT humana en ratones transgénicos

N.º de compuesto	Dosis (mg/kg)	% de inhibición (ARN de AGT) en el hígado	ED50 (mg/kg)	% de inhibición (proteína AGT) en plasma
1205407	5.0	98	0.14	96
	1.7	93		90
	0.6	85		80
	0.2	56		37
	0.1	30		29
1205408	5.0	98	0.27	95
	1.7	93		88
	0.6	73		76
	0.2	37		23
	0.1	9		0
1250837	5.0	85	0.53	83
	1.7	84		84
	0.6	57		64
	0.2	26		40
	0.1	0		46
1250851	5.0	94	0.23	95
	1.7	89		91
	0.6	76		76
	0.2	32		49
	0.1	32		37

ESTUDIO 355 *Análisis de ARN y proteínas*

[0266] Se extrajo ARN del tejido hepático para el análisis de PCR en tiempo real para medir la cantidad de ARN de AGT utilizando el conjunto de sonda de cebador humano RTS3721 (descrito anteriormente en el presente documento). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición del ARN de AGT en relación con el control salino, normalizado al contenido total de ARN, medido por RIBOGREEN®. Además, se extrajo plasma para medir los niveles de proteína AGT humana en plasma mediante un kit ELISA (Human Total Angiotensinogen Assay Kit, IBL, Cat#27412). Los resultados se presentan como porcentaje de inhibición de la proteína AGT en relación con el control salino. Tal como se utiliza aquí, un valor de "0" indica que el tratamiento con el oligonucleótido modificado no inhibió los niveles de AGT.

65

Tabla 20

Reducción de proteína y ARN de AGT humana en ratones transgénicos

N.º de compuesto	Dosis (mg/kg)	% de inhibición (ARN de AGT) en el hígado	ED50 (mg/kg)	ED75 (mg/kg)	% de inhibición (proteína AGT) en plasma
757456	10	88	2.1	2.68	88
	3.3	74			72
	0.1	0			0
	0.04	0			0
1205407	1.5	86	0.11	0.38	87
	0.5	68			62
	0.17	38			29
	0.06	35			11
1176644	1.5	76	0.38	0.61	71
	0.5	62			51
	0.17	0			5
	0.06	0			0
1250837	1.5	74	0.22	0.67	67
	0.5	60			52
	0.17	38			28
	0.06	0			0
1176649	1.5	83	0.20	0.59	82
	0.5	50			56
	0.17	17			17
	0.06	0			0

Ejemplo 7: Inhibición de AGT humana *in vitro* dependiente de la dosis en hepatocitos de ratones transgénicos

55 **[0267]** En este estudio se utilizó el modelo de ratón transgénico AGT descrito anteriormente. Los oligonucleótidos modificados descritos en los estudios anteriores se sometieron a pruebas de inhibición del ARN de AGT a varias dosis en hepatocitos primarios de ratón extraídos de estos ratones transgénicos.

60 **[0268]** Los hepatocitos transgénicos primarios de ratón se sembraron a una densidad de 20.000 células por pocillo y se trataron por captación libre con oligonucleótidos modificados diluidos a diferentes concentraciones según se especifica en las tablas siguientes. Tras una incubación de una noche, se midieron los niveles de ARN de AGT utilizando el conjunto cebador-sonda de AGT humana RTS3721 (secuencia directa CCCTGATGGGAGCCAGTGT, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 3; secuencia inversa AGCAGGGAGAAGCCCTTCA, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 4; secuencia de sonda CCCTGGCTTTCAACACCTACGTCCACT, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 5). Además, se confirmaron los datos de un segundo conjunto de sondas de cebado AGT humanas RTS4039 (secuencia directa GGACAAGGTGGAGGGTCTCA, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 6;

secuencia inversa AGATCCTTGCAGCACCAGTTG, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 7; secuencia de sonda ATGAAGAACTATCTCCCCGGACCATCCA, designada en el presente documento como SEQ ID N.º: 8) para medir los niveles de ARN AGT humano. Los niveles de ARN de AGT se normalizaron con respecto al contenido total de ARN, medido mediante RIBOGREEN®. Los resultados se presentan en las tablas siguientes como porcentaje de inhibición de AGT, en relación con las células de control no tratadas. Tal como se utiliza en el presente documento, un valor "0" indica que el tratamiento con el oligonucleótido modificado no inhibió los niveles de ARNm de AGT. También se presenta la concentración inhibitoria media máxima (IC₅₀) de cada oligonucleótido modificado. La IC₅₀ se calculó mediante una regresión no lineal utilizando el método de pendiente variable de 4 parámetros de log(inhibidor) frente a la respuesta con la parte inferior y superior fijadas en 0 y 100, respectivamente (Prism).

Tabla 21

Ensayo multidosis de oligonucleótidos modificados en hepatocitos primarios de ratón

N.º de compuesto	% de inhibición (RTS3721)								IC ₅₀ (µM)
	0.61 nM	2.44 nM	9.77 nM	39.06 nM	156.25 nM	625 nM	2500 nM	10000 nM	
757456	0	0	0	0	39	52	32	20	868
1205407	36	19	51	74	86	94	88	77	8
1176644	0	8	25	51	79	88	86	88	35
1176649	0	0	25	33	60	74	72	53	95
1250837	0	0	12	27	61	67	72	73	145

Tabla 22

Ensayo multidosis de oligonucleótidos modificados en hepatocitos primarios de ratón

N.º de compuesto	% de inhibición (RTS4039)								IC ₅₀ (µM)
	0.61 nM	2.44 nM	9.77 nM	39.06 nM	156.25 nM	625 nM	2500 nM	10000 nM	
757456	0	0	0	3	43	50	37	7	709
1205407	27	21	44	69	84	89	87	83	12
1176644	0	16	16	48	74	85	82	82	43
1176649	0	0	13	35	55	74	73	65	116
1250837	2	0	14	28	57	66	70	67	169

Ejemplo 8: Inhibición de AGT humana *ex vivo* dependiente de la dosis en HepatoPac®

[0269] El kit HepatoPac® es un sistema de modelo hepático disponible comercialmente en BIOIVT que consiste en "islas" de hepatocitos micropatternados co-cultivados con células estromales de apoyo. Una placa HepatoPac de 96 pocillos se equilibró durante 48 h a 37 °C y 10% de CO₂ en medio de mantenimiento fresco antes del tratamiento. Los oligonucleótidos modificados se diluyeron en el medio de mantenimiento a las concentraciones descritas en la tabla siguiente durante 48 horas. Después de 48 horas, el medio se sustituyó por medio de mantenimiento fresco sin oligonucleótido adicional. Los lisados celulares se recogieron a las 96 horas de la adición del oligonucleótido y se analizaron mediante RT-PCR utilizando el conjunto de sondas de cebado RTS3721 (descrito anteriormente). Los resultados se presentan en las tablas siguientes como porcentaje de inhibición de AGT, en relación con las células de control no tratadas. Tal como se utiliza en el presente documento, un valor "0" indica que el tratamiento con el oligonucleótido modificado no inhibió los niveles de ARNm de AGT. Las IC₅₀ se calcularon mediante regresión logística de 4 parámetros de pendiente variable en Prism, con la parte inferior y superior de las curvas fijadas en 5 y 100, respectivamente.

Tabla 23

Ensayo multidosis de oligonucleótidos modificados en células Hepatopac®

N.º de compuesto	% de inhibición						IC ₅₀ (µM)
	6.4 nM	32 nM	160 nM	800 nM	4000 nM	20000 nM	
757456	31	31	21	16	29	16	>20
1250850	0	3	18	61	78	86	0.85
1205407	27	52	70	84	93	92	0.04
1205410	9	46	63	89	95	99	0.06

Ejemplo 9: Efecto de oligonucleótidos modificados dirigidos a la AGT humana en monos cynomolgus

[0270] Los monos Cynomolgus fueron tratados con oligonucleótidos modificados seleccionados de los estudios descritos en los Ejemplos anteriores.

Tratamiento

[0271] Antes del estudio, los monos fueron mantenidos en cuarentena, seguido de un periodo de aclimatación durante el cual los animales fueron observados diariamente para comprobar su estado general de salud. Los monos tenían entre 2 y 4 años y pesaban entre 2 y 4 kg. Nueve grupos de 4 monos macho cynomolgus asignados al azar fueron inyectados cada uno por vía subcutánea con oligonucleótido de lonis o solución salina en una rotación en el sentido de las agujas del reloj entre cuatro sitios diferentes de la espalda. Tras las dosis de carga de los días 1, 4 y 8, los monos recibieron una dosis semanal (los días 15, 22, 29, 36, 43, 50, 57, 64, 71, 78 y 85) de 20 mg/kg de oligonucleótido lonis. Un grupo de control de 4 monos cynomolgus fue inyectado con solución salina al 0,9% de manera similar y sirvió como grupo de control.

[0272] Durante el período de estudio, los monos fueron observados al menos una vez al día para detectar signos de enfermedad o angustia. Todos los animales que mostraban signos de debilidad o toxicidad graves, en particular si su muerte parecía inminente, eran eutanasiados por razones humanitarias lo antes posible, previa consulta con el veterinario. La eutanasia programada de los animales se realizó el día 87, aproximadamente 48 horas después de la última dosis, mediante desangrado bajo anestesia profunda. Los protocolos descritos en el Ejemplo fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

Medición del peso corporal y de los órganos

[0273] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos lonis sobre la salud general de los animales, se midieron los pesos del cuerpo y de los órganos. Se midió el peso corporal terminal antes de la necropsia. También se midieron los pesos de los órganos, y todas las mediciones de peso se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 24

Pesos corporales y de órganos (g)

N.º de compuesto	Peso corporal terminal	Hígado con vesícula biliar	Riñones	Bazo
Solución salina	2967	60	13	3
1205407	2956	96	15	5
1205408	2971	72	13	3
1205410	2868	101	14	4
1231463	2923	69	13	5
1250835	2949	93	16	6
1250836	2973	71	14	6
1250837	2712	63	15	3
1250850	3044	97	17	5
1250851	2806	63	15	3

Función renal y hepática

[0274] Para evaluar el efecto de los oligonucleótidos Ionis sobre la función hepática y renal, se tomaron muestras de sangre de todos los grupos de estudio el día 87. Los monos pasaron la noche en ayunas antes de la extracción de sangre. La sangre se recogió en tubos sin anticoagulante para la separación del suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante un mínimo de 90 minutos y después se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos para obtener suero. Los niveles de diversos marcadores de la función hepática se midieron con un analizador químico Toshiba 200FR NEO (Toshiba Co., Japón). Se midieron los niveles plasmáticos de nitrógeno ureico en sangre (BUN), creatinina (CREA), proteínas totales (TP), albúmina (ALB), globulina (GLO), relación albúmina/globulina (A/G) calculada, alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), bilirrubina total (TBIL), y los resultados se presentan en la tabla siguiente.

Tabla 25

Marcadores de función hepática en plasma de mono cynomolgus

N.º de compuesto	BUN (mg/dL)	CREA (mg/dL)	TP (g/dL)	ALB (g/dL)	GLO (g/dL)	Relación A/G	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	TBIL (mg/dL)
Solución salina	28	0.8	6.9	4.1	2.8	1.5	50	57	0.25
1205407	23	0.8	6.9	4.0	2.9	1.4	67	55	0.20
1205408	26	0.8	6.7	4.0	2.7	1.5	53	50	0.27
1205410	21	0.9	6.9	3.9	3.0	1.3	145	72	0.26
1231463	22	0.8	7.3	4.0	3.4	1.2	112	75	0.26
1250835	19	0.9	7.4	3.8	3.6	1.1	129	82	0.25
1250836	23	1.1	7.7	3.9	3.8	1.1	150	95	0.34
1250837	21	0.8	6.9	4.2	2.7	1.6	91	68	0.28
1250850	21	0.8	7.4	4.0	3.4	1.2	85	86	0.25
1250851	20	0.8	6.8	4.1	2.7	1.6	63	64	0.27

50 *Análisis de proteínas proinflamatorias*

[0275] Para evaluar cualquier efecto inflamatorio de los oligonucleótidos modificados con Ionis en monos cynomolgus, se tomaron muestras de sangre para su análisis. Los monos pasaron la noche en ayunas antes de la extracción de sangre. El día 85 (antes de la dosis y 24 horas después de la dosis), se extrajeron aproximadamente 0,8 ml de sangre de cada animal y se introdujeron en tubos sin anticoagulante para separar el suero. Los tubos se mantuvieron a temperatura ambiente durante un mínimo de 90 min y después se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente para obtener suero. El complemento C3 se midió utilizando un analizador químico Toshiba 120 FR NEO (Toshiba Co., Japón). Se analizó otro marcador de inflamación, la proteína C reactiva (PCR), junto con los parámetros de química clínica analizados anteriormente para la función hepática.

60

65

Tabla 26

Análisis de proteínas proinflamatorias en monos cynomolgus

N.º de compuesto	Complemento C3 (mg/dL)		CRP (mg/L)
	Día 85 (antes de la dosis)	Día 86 (24 horas después de la dosis)	Día 87
Solución salina	110	110	2
1205407	94	91	10
1205408	93	93	4
1205410	117	111	14
1231463	92	102	6
1250835	84	75	15
1250836	78	82	9
1250837	82	87	1
1250850	86	83	12
1250851	86	92	3

Hematología

[0276] Para evaluar cualquier efecto de los oligonucleótidos modificados por Ionis en monos cynomolgus sobre los parámetros hematológicos, se tomaron muestras de sangre de aproximadamente 0.5 mL de sangre de cada uno de los animales de estudio disponibles el día 87. Las muestras se recogieron en tubos que contenían K₂-EDTA. Se analizaron las muestras para determinar el recuento de glóbulos rojos (RBC), la hemoglobina (HGB), el hematocrito (HCT), el volumen corpuscular medio (MCV), la hemoglobina corpuscular media (MCH), la concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC), recuento de plaquetas (PLT), recuento de glóbulos blancos (WBC), recuentos individuales de glóbulos blancos, como el de monocitos (MON), neutrófilos (NEU) y linfocitos (LYM) utilizando un analizador hematológico ADVIA2120i (Siemens, EE.UU.).

Tabla 27

Recuento de células sanguíneas en monos cynomolgus											
Compuesto No.	WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	HGB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	NEU (%)	LYM (%)	MON (%)	PLT ($\times 10^3/\mu\text{L}$)
saline	13	6	14	45	78	24	30	39	55	4	403
1205407	11	6	13	43	77	23	30	40	56	3	377
1205408	12	6	13	44	78	23	30	43	51	3	375
1205410	8	6	13	45	81	24	30	32	63	2	312
1231463	10	6	13	45	78	24	30	28	66	3	338
1250835	10	6	14	47	79	24	30	28	65	4	370
1250836	12	6	14	45	75	23	31	28	66	3	354
1250837	7	6	13	43	77	24	31	37	59	3	288
1250850	6	5	13	42	76	23	30	29	66	3	376
1250851	9	6	14	45	77	24	31	45	51	2	356

Análisis de orina

[0277] Se retiró la comida durante la noche del día anterior a la recogida de orina fresca, pero se suministró agua. Se recogieron muestras de orina fresca para análisis de orina y química urinaria de todos los animales utilizando una bandeja de jaula limpia sobre hielo húmedo (a primera hora de la mañana) el día 87. Los parámetros de análisis de orina/química urinaria incluyen creatinina (UCRE), relación proteínas/creatinina (P/C), microproteínas (UTP) y microalbúmina urinaria (UALB), que se midieron con un analizador químico automatizado Toshiba 120FR (Toshiba Co., Japón).

Tabla 28

Análisis de orina y marcadores químicos de orina en monos cynomolgus

N.º de compuesto	UTP (mg/dL)	UALB (mg/dL)	Proporción P/C	UCRE (mg/dL)
Solución salina	7	0.57	0.15	55
1205407	7	0.29	0.19	37
1205408	7	0.47	0.14	52
1205410	7	0.34	0.19	52
1231463	7	0.37	0.13	63
1250835	12	0.58	0.14	95
1250836	10	0.54	0.11	114
1250837	7	0.41	0.16	49
1250850	7	0.55	0.08	105
1250851	9	0.74	0.07	140

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto oligomérico que comprende un oligonucleótido modificado según la siguiente notación química:
 $mC_{es}G_{eo} mC_{ko}T_{ds}G_{ds}A_{ds}T_{ds}T_{ds}T_{ds}G_{ds}T_{ds} mC_{ds} mC_{ds}G_{ko}G_{ks}G_e$ (SEQ ID N.º: 12), en la que:

5

- A = una nucleobase de adenina,
- mC = una nucleobase 5-metil citosina,
- G = una nucleobase de guanina,
- T = una nucleobase de timina,
- e = una fracción de azúcar 2'-β-D-MOE,
- k = una fracción de azúcar cEt,
- d = una fracción de azúcar 2'-β-D-desoxirribosil,
- s = un enlace internucleósido fosforotioato, y
- o = un enlace fosfodiéster internucleósido.

10

15

2. El compuesto oligomérico de la reivindicación 1, que comprende el oligonucleótido modificado unido covalentemente a un grupo conjugado.

20

3. El compuesto oligomérico de la reivindicación 2, en el que el grupo conjugado comprende un enlazador conjugado formado por un enlace simple.

4. El compuesto oligomérico de la reivindicación 2 o de la reivindicación 3, en el que el grupo conjugado comprende un enlazador escindible.

25

5. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en el que el grupo conjugado comprende un enlazador conjugado que comprende 1-3 nucleósidos enlazadores.

6. El compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en el que el grupo conjugado está unido al oligonucleótido modificado en el extremo 3' y/o 5' del oligonucleótido modificado.

30

7. El compuesto oligomérico de la reivindicación 2, según la siguiente estructura química:

35

40

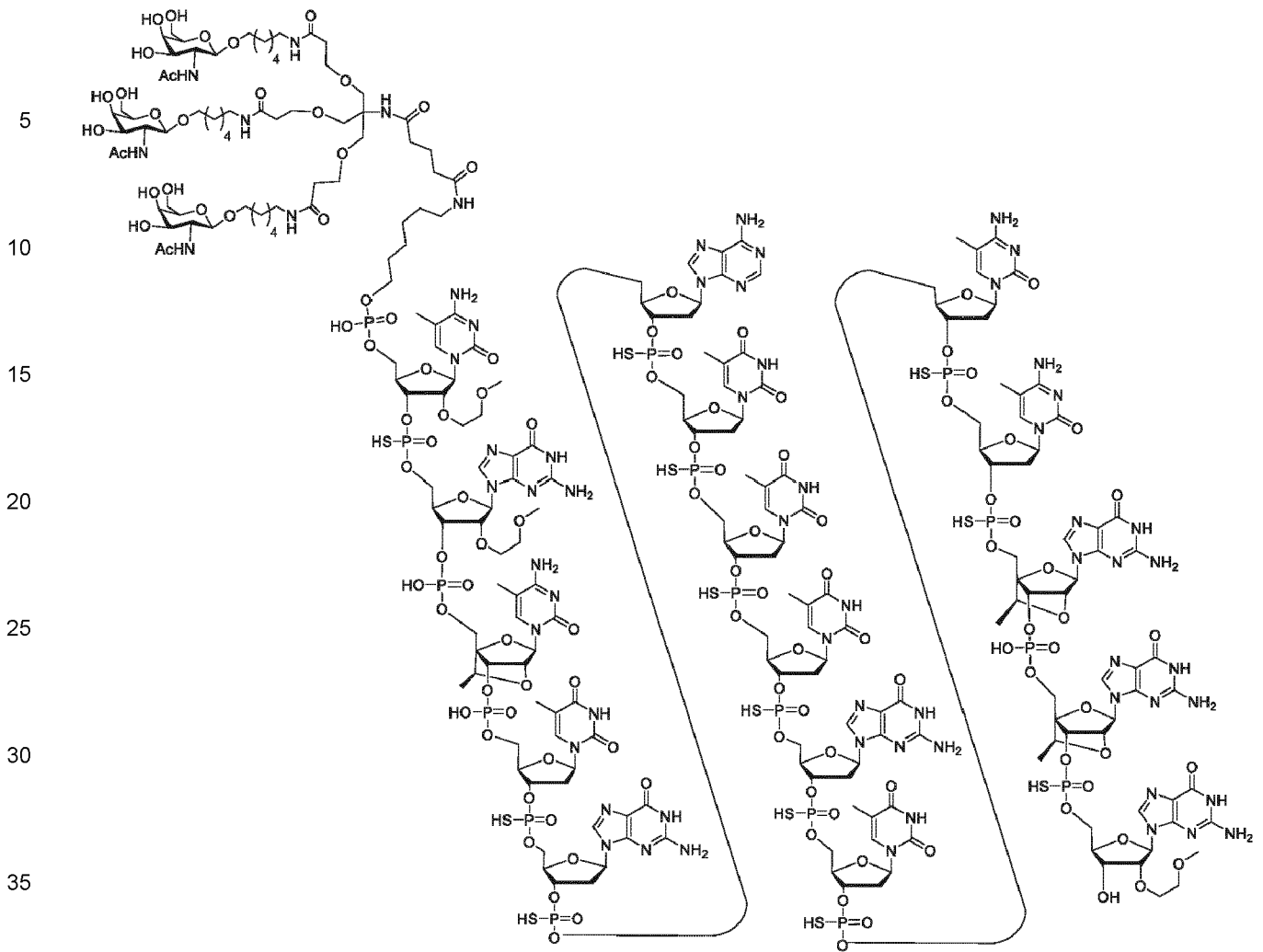
45

50

55

60

65



40 (SEQ ID N.º: o una sal del mismo.

8. El compuesto oligomérico de la reivindicación 2, según la siguiente estructura química:

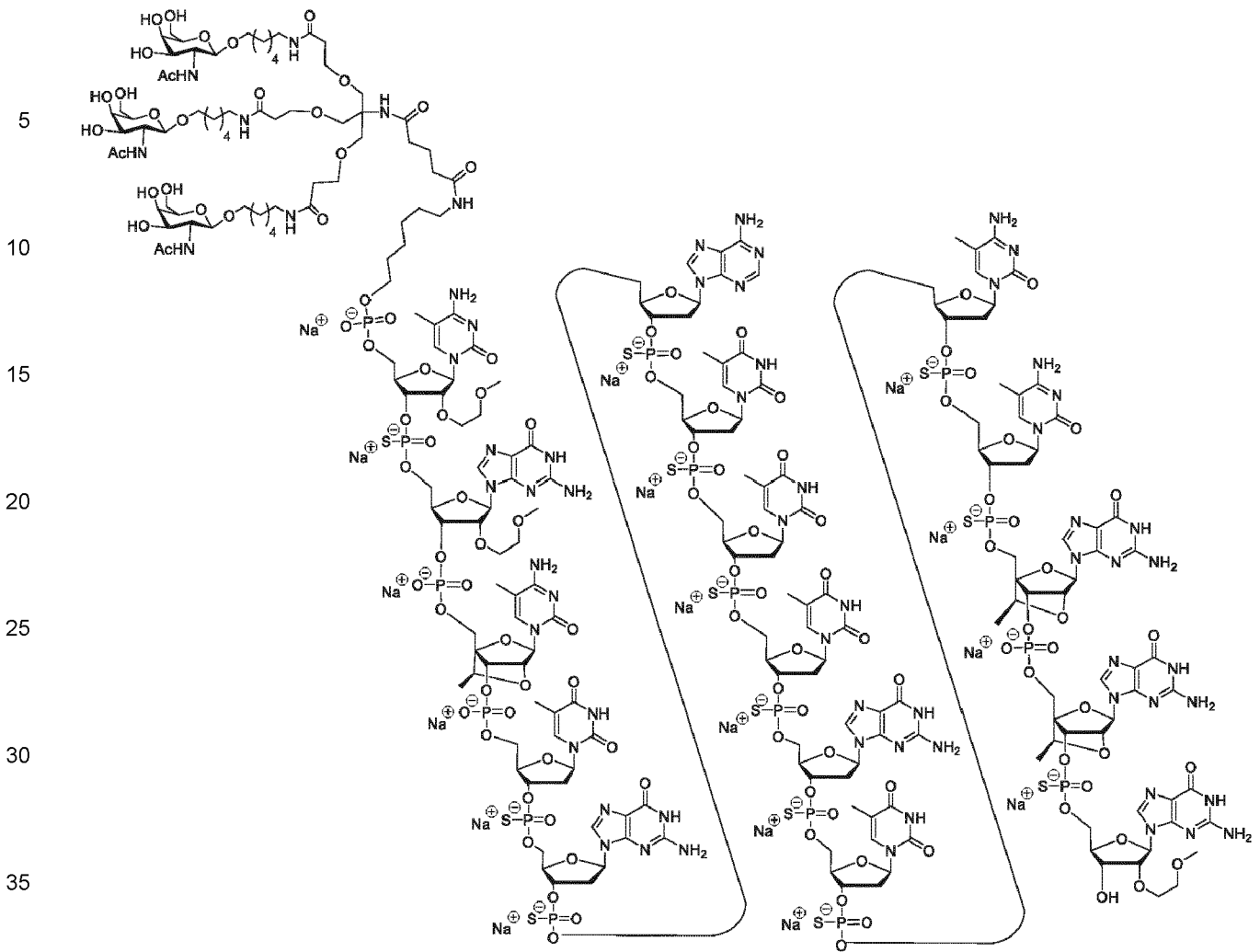
45

50

55

60

65



40 (SEQ ID N.º: 12).

9. El compuesto oligomérico de la reivindicación 7, que es la sal sódica o la sal potásica.

45 10. Una población de compuestos oligoméricos de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que todos los enlaces internucleósidos fosforotioato del compuesto oligomérico son estereorándomicos.

11. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto oligomérico de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, o la población de la reivindicación 10 y un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en la que el diluyente farmacéuticamente aceptable es agua o PBS.

55 13. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 o de la reivindicación 12, para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad asociada a la vía del RAAS, que comprende administrar a un individuo que tiene o corre el riesgo de tener una enfermedad asociada a la vía del RAAS una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica, tratando así la enfermedad asociada a la vía del RAAS, en la que:

(i) la enfermedad es una enfermedad cardiovascular; y/o

60 (ii) la enfermedad se selecciona entre hipertensión, hipertensión resistente, síndrome de Marfan, insuficiencia cardíaca, enfermedad renal, obesidad, síndrome metabólico, NASH y NAFLD.

14. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 13, en la que se mejora al menos un síntoma o sello distintivo de la enfermedad, en la que el síntoma o sello distintivo es cualquiera de hipertensión, emergencia hipertensiva (es decir, hipertensión maligna), accidente cerebrovascular, preeclampsia, aneurismas de los vasos sanguíneos, aneurisma abdominal, enfermedad arterial periférica, daño orgánico o hipertensión arterial pulmonar.

15. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en la que la composición farmacéutica se administra por vía sistémica, opcionalmente en la que la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea o intramuscular.