

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 932 295**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2019 PCT/EP2019/081158**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2020 WO20099476**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2019 E 19801033 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.09.2022 EP 3880818**

54 Título: **Ácidos nucleicos para inhibir la expresión de LPA en una célula**

30 Prioridad:

13.11.2018 WO PCT/EP2018/081106

14.05.2019 EP 19174466

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

17.01.2023

73 Titular/es:

**SILENCE THERAPEUTICS GMBH (100.0%)
Robert-Rössle-Strasse 10
13125 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**RIDER, DAVID ANTHONY;
BETHGE, LUCAS;
FRAUENDORF, CHRISTIAN;
WEINGAERTNER, ADRIEN;
HAUPTMANN, JUDITH;
DAMES, SIBYLLE;
SCHUBERT, STEFFEN y
TENBAUM, STEPHAN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 932 295 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

Ácidos nucleicos para inhibir la expresión de LPA en una célula

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a productos y composiciones y a sus usos. En particular, la invención se refiere a productos de ácido nucleico que interfieren con la expresión del gen *LPA* o que inhiben su expresión. Este tratamiento terapéutico reductor de la Lp(a) sirve para prevenir y reducir el riesgo de sufrir un ictus, aterosclerosis, trombosis y enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria y estenosis de la válvula aórtica o cualquier otro trastorno, patología o síndrome relacionado con niveles elevados de partículas de Lp(a).

Antecedentes

15 Se ha demostrado que los ARN bicatenarios (ARNbc) capaces de unirse de manera complementaria al ARNm expresado pueden bloquear la expresión génica (Fire *et al.*, 1998, *Nature*. 19 de febrero de 1998; 391(6669):806-11 y Elbashir *et al.*, 2001, *Nature*. 24 de mayo de 2001; 411(6836):494-8) mediante un mecanismo que se ha denominado interferencia por ARN (iARN). Los ARNbc cortos dirigen el silenciamiento postranscripcional específico de los genes en muchos organismos, incluidos los vertebrados, y se han convertido en una herramienta útil para estudiar la función de los genes. La iARN está mediada por el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, del inglés *RNA induced silencing complex*), una nucleasa multicomponente específica de secuencia que degrada los ARN mensajeros homólogos al desencadenante del silenciamiento cargado en el complejo RISC. Los ARN de interferencia (denominados en el presente documento ARNi) tales como los ARNip, los ARN antisentido y los microARN son oligonucleótidos que evitan la formación de proteínas mediante el silenciamiento génico, es decir, la inhibición de la traducción génica de la proteína a través de la degradación de las moléculas de ARNm. Los agentes silenciadores de genes son cada vez más importantes para aplicaciones terapéuticas en medicina.

De acuerdo con Watts y Corey en el *Journal of Pathology* (2012; Vol 226, p 365 379) hay algoritmos que se pueden utilizar para diseñar desencadenantes del silenciamiento de ácidos nucleicos, pero todos estos tienen limitaciones importantes. Pueden ser necesarios varios métodos experimentales para identificar potentes ARNi, ya que los algoritmos no tienen en cuenta factores tales como la estructura terciaria del ARNm diana o la participación de las proteínas de unión al ARN. Por lo tanto, el descubrimiento de un potente desencadenante del silenciamiento de ácidos nucleicos con efectos colaterales mínimos es un proceso complejo. Para el desarrollo farmacéutico de estas moléculas altamente cargadas es necesario que se puedan sintetizar económicamente, distribuirse a los tejidos diana, entrar en las células y funcionar dentro de los límites aceptables de toxicidad.

Las partículas de Lp(a) son partículas heterogéneas de lipoproteínas de baja densidad que se expresan predominantemente en el hígado (Witztum y Ginsberg, *J Lipid Res.* marzo de 2016; 57(3):336-9). Están compuestos por apolipoproteína (a) (Apo(a) o Lp(a) codificada por el gen *LPA*) unida a una partícula similar a LDL a través del polipéptido ApoB. Los elevados niveles séricos de partículas de Lp(a) definidos genéticamente no se ven afectados por la dieta y el ejercicio y están asociados con un mayor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares a través del potencial aterosclerótico asociado (Alonso *et al.*, *Journal of the American College of Cardiology*, vol. 63, n.º 19, 2014). En términos de diagnóstico y medicina preventiva, el nivel sérico de partículas de Lp(a) del paciente es un factor de riesgo genético independiente y altamente prevalente para cardiopatía coronaria y estenosis de la válvula aórtica (Saeedi y Frohlich, *Clinical Diabetes and Endocrinology* (2016) 2:7). Actualmente no existe una terapia de reducción de partículas de Lp(a) específica aprobada más allá de las medidas indirectas convencionales generales de reducción de LDL. En consecuencia, en la actualidad se necesitan métodos para el tratamiento eficaz, la prevención y la reducción del riesgo de padecer trastornos tales como, y asociados con, el ictus, la aterosclerosis, la trombosis y las enfermedades cardiovasculares tales como la cardiopatía coronaria, estenosis de la válvula aórtica y otros trastornos, patologías o síndromes asociados aún no identificados. La presente invención aborda esta necesidad médica no satisfecha.

Tadin-Strapps *et al.*, *J. Cardiovasc. Trans. Res.* (2015), 8;44-53 describe el desarrollo de ARNip de lipoproteína (a) para estudios de los mecanismo de acción en modelos de aterosclerosis en primates no humanos.

55 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región doble que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos de

65 5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3' (SEQ ID NO: 165), y en donde dicha segunda cadena comprende un secuencia de nucleótidos de
5' mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 163);

en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro; mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2-O-metilo; y (ps) indica un enlace fosforotioato.

5 La invención también proporciona una composición que comprende el ácido nucleico o el ácido nucleico conjugado de acuerdo con la invención y, opcionalmente, un excipiente fisiológicamente aceptable.

También se proporciona un ácido nucleico de acuerdo con la invención para su uso como medicamento.

10 También se proporciona un ácido nucleico o un ácido nucleico conjugado de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o síndrome y/o en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad, trastorno o síndrome.

15 También se incluye un método para preparar el ácido nucleico o el ácido nucleico conjugado de acuerdo con la invención.

20 El ácido nucleico o la composición que comprende el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención puede utilizarse en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o síndrome. El tratamiento puede ser para prevenir y reducir el riesgo de padecer un ictus, aterosclerosis, trombosis o enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria o estenosis de la válvula aórtica y cualquier otra enfermedad o patología asociada a niveles elevados de partículas que contienen Lp(a).

Descripción detallada

25 La presente invención se refiere a un ácido nucleico bicatenario y dirigido a un transcrito de ARN expresado de *LPA* y a composiciones del mismo. Estos ácidos nucleicos o ácidos nucleicos conjugados se pueden utilizar en el tratamiento y la prevención de varias enfermedades, trastornos y síndromes donde es deseable una expresión reducida del producto génico *LPA*.

30 La invención proporciona un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región doble que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos de

35 5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3' (SEQ ID NO: 165), y en donde dicha segunda cadena comprende un secuencia de nucleótidos de 5' mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 163); en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro; mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2-O-metilo; y (ps) indica un enlace fosforotioato.

40 En algunas realizaciones, se proporciona un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región doble que comprende una primera cadena y una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de un ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos de

45 5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3' (SEQ ID NO: 165), y en donde dicha segunda cadena comprende un secuencia de nucleótidos de 5' mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 163); en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro; mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2-O-metilo; y (ps) indica un enlace fosforotioato.

50 Dichos ácidos nucleicos son capaces de reducir de manera eficaz la expresión de *LPA* en una célula y son muy estables. Preferentemente, el ácido nucleico de la invención es capaz de inhibir la expresión de *LPA* en una célula a un grado similar, tal como el mismo, o mayor al de los mismos ácidos nucleicos con un patrón de modificación diferente en condiciones comparables. De manera más específica, preferentemente, el ácido nucleico de la invención es capaz de inhibir la expresión de *LPA* en una célula en un 80, 90, 100, 105, 110 o más por ciento en comparación con el mismo ácido nucleico con un patrón de modificación diferente en condiciones comparables.

60 El ácido nucleico puede: a) tener extremos romos en ambos extremos; b) tener un saliente en un extremo y un extremo romo en el otro; o c) tener un saliente en ambos extremos. Preferentemente, el ácido nucleico tiene extremos romos en ambos extremos.

65 Estos ácidos nucleicos, entre otros, tienen la ventaja de ser activos en varias especies que son fundamentales para el desarrollo preclínico y clínico y/o de tener pocos efectos colaterales importantes, además de ser estables *in vivo* y tener una larga duración de acción. También comprenden relativamente pocos nucleótidos modificados de origen no

natural pero, no obstante, son capaces de inhibir de manera eficaz el gen diana durante largos periodos de tiempo. El patrón de modificación específico con pocos nucleótidos modificados de origen no natural (nucleótidos modificados 2'F) también facilita su síntesis.

5 En algunas realizaciones, la primera cadena consiste en una secuencia de nucleótidos de

5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3' (SEQ ID NO: 165);
en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro; mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos
de 2-O-metilo; y (ps) indica un enlace fosforotioato.

10

En algunas realizaciones, la segunda cadena consiste en una secuencia de nucleótidos de

5' mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 163);
en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro; mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos
de 2-O-metilo; y (ps) indica un enlace fosforotioato.

15

El gen *LPA* comprende secuencias altamente repetitivas. Los ácidos nucleicos de la primera cadena con secuencias muy similares pueden, por lo tanto, tener una perfecta complementariedad de secuencias con regiones diana muy diferentes del ARNm.

20

En el presente documento, cuando se hace referencia a una secuencia de referencia que comprende o consiste en nucleótidos no modificados, esta referencia no se limita a la secuencia con nucleótidos no modificados. La misma referencia también abarca la misma secuencia de nucleótidos en la que uno, varios, tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más, incluidos todos, los nucleótidos se modifican mediante modificaciones tales como 2'-OMe, 2'-F, un ligando, un enlazador, una modificación del extremo 3' o del extremo 5' o cualquier otra modificación. También se refiere a secuencias en las que dos o más nucleótidos están unidos entre sí mediante el enlace fosfodiéster natural o mediante cualquier otro enlace tal como un enlace fosforotioato o fosforoditioato.

25

Un ácido nucleico bicatenario es un ácido nucleico en el que la primera cadena y la segunda cadena se hibridan entre sí en al menos una parte de sus longitudes y, por lo tanto, son capaces de formar una región doble en condiciones fisiológicas, tales como en PBS a 37 °C a una concentración de 1 μM de cada cadena. Por ejemplo, una primera y una segunda cadena pueden hibridarse entre sí y, por lo tanto, formar una región doble en una región de al menos 15 nucleótidos, preferentemente 16, 17, 18 o 19 nucleótidos. Esta región doble comprende emparejamientos de bases de nucleótidos entre las dos cadenas, preferentemente basado en el emparejamiento de bases de Watson-Crick y/o en el emparejamiento de bases oscilantes (tal como el emparejamiento de bases GU). No es necesario que todos los nucleótidos de las dos cadenas de una región doble se emparejen entre sí para formar una región doble. Se aceptan un determinado número de emparejamientos incorrectos, eliminaciones o inserciones entre las secuencias de nucleótidos de las dos cadenas. También son posibles salientes en cualquiera de los extremos de la primera o la segunda cadena o nucleótidos no emparejados en cualquier extremo del ácido nucleico bicatenario. El ácido nucleico bicatenario puede ser un ácido nucleico bicatenario estable en condiciones fisiológicas y puede tener una temperatura de fusión (T_m) de 45 °C o más, preferentemente 50 °C o más y más preferentemente 55 °C o más, por ejemplo, en PBS a una concentración de 1 μM y cada una de la primera cadena y la segunda cadena pueden ser capaces de formar una región doble (es decir, son complementarias entre sí) a lo largo de i) al menos una parte de sus longitudes, preferentemente a lo largo de al menos 15 nucleótidos de ambas longitudes, ii) a lo largo de la longitud total de la primera cadena, iii) a lo largo de la longitud total de la segunda cadena y/o iv) a lo largo de la longitud total de la primera y la segunda cadena. Las cadenas que son complementarias entre sí en una determinada longitud significa que las cadenas pueden formar pares de bases entre sí, ya sea a través de Watson-Crick o emparejamiento de bases oscilantes, a lo largo de esa longitud. Cada nucleótido de la longitud no necesariamente tiene que ser capaz de formar pares de bases con su homólogo en la otra cadena a lo largo de toda la longitud dada siempre que se pueda formar un nucleótido bicatenario estable en condiciones fisiológicas. Sin embargo, esto es lo preferido.

30

35

40

45

50

Se pueden tolerar un determinado número de emparejamientos incorrectos, eliminaciones o inserciones entre la primera cadena (antisentido) y la secuencia diana, o entre la primera cadena y la segunda cadena (de sentido) en el contexto de ARNip y, en determinados casos, incluso tienen la posibilidad de aumentar la actividad.

55

Por ácido nucleico se entiende un ácido nucleico que comprende dos cadenas que comprenden nucleótidos, que es capaz de interferir con la expresión génica. La inhibición puede ser completa o parcial y da como resultado la regulación negativa de la expresión génica de una manera dirigida. El ácido nucleico comprende dos cadenas de polinucleótidos separadas; la primera cadena, que también puede ser una cadena guía; y una segunda cadena, que también puede ser una cadena pasajero. La primera cadena y la segunda cadena pueden ser parte de la misma molécula polinucleotídica que es autocomplementaria y que se 'pliega' para formar una molécula bicatenaria. El ácido nucleico puede ser una molécula de ARNip.

60

Los ácidos nucleicos pueden comprender ribonucleótidos, ribonucleótidos modificados, desoxinucleótidos, desoxirribonucleótidos o análogos de nucleótidos no nucleótidos que son capaces de imitar nucleótidos de tal manera que pueden 'emparejarse' con la base correspondiente en la secuencia diana o cadena complementaria. Dicho ácido

65

nucleico puede comprender además una parte de ácido nucleico bicatenario o región doble formada por toda o una parte de la primera cadena (también conocida en la materia como cadena guía) y toda o una parte de la segunda cadena (también conocida en la materia como cadena pasajera). La región doble se define como que comienza con el primer par de bases formado entre la primera cadena y la segunda cadena y termina con el último par de bases formado entre la primera cadena y la segunda cadena, ambos inclusive.

Por región doble se entiende la región en dos oligonucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios que forman pares de bases entre sí, ya sea mediante apareamiento de bases de Watson-Crick o de cualquier otra manera que permita un doble entre cadenas oligonucleotídicas que sean complementarias o sustancialmente complementarias. Por ejemplo, una cadena de oligonucleótidos que tiene 21 unidades de nucleótidos puede emparejarse con otro oligonucleótido de 21 unidades de nucleótidos, aunque solo 19 nucleótidos en cada cadena son complementarios o sustancialmente complementarios, de manera que la "región doble" consiste en 19 pares de bases. Los pares de bases restantes pueden existir como salientes en 5' y 3' o como regiones monocatenarias. Además, dentro de la región doble, no se requiere el 100 % de complementariedad; se permite una complementariedad sustancial dentro de una región doble. Complementariedad sustancial se refiere a la complementariedad entre las cadenas de manera que sean capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Se conocen bien en la materia técnicas para determinar empíricamente si dos cadenas son capaces de hibridarse en condiciones biológicas. Como alternativa, pueden sintetizarse dos cadenas y añadirse juntas en condiciones biológicas para determinar si se hibridan entre sí.

La parte de la primera cadena y de la segunda cadena que forman al menos una región doble pueden ser totalmente complementarias o ser al menos parcialmente complementarias entre sí.

Dependiendo de la longitud de un ácido nucleico, no se requiere necesariamente un emparejamiento perfecto en términos de complementariedad de bases entre la primera cadena y la segunda cadena. Sin embargo, las cadenas primera y segunda deben ser capaces de hibridarse en condiciones fisiológicas.

La complementariedad entre la primera cadena y la segunda cadena en la al menos una región doble puede ser perfecta en el sentido de que no hay emparejamientos incorrectos de nucleótidos o nucleótidos adicionales/eliminados en ninguna de las cadenas. Como alternativa, la complementariedad puede no ser perfecta. La complementariedad puede ser de aproximadamente un 70 % a aproximadamente el 100 %. De manera más específica, la complementariedad puede ser de al menos un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % y valores intermedios.

Como se divulga en el presente documento, "una parte de" como, por ejemplo, en "una región doble que comprende al menos una parte de una primera cadena" debe entenderse que significa que la región doble comprende al menos 10, preferentemente al menos 12, más preferentemente al menos 14, aún más preferentemente al menos 16, incluso más preferentemente al menos 18 y lo más preferentemente todos los nucleótidos de una secuencia de la cadena de referencia dada. La parte de la secuencia de referencia en la región doble es al menos un 70 %, preferentemente al menos un 80 %, más preferentemente al menos un 90 %, aún más preferentemente al menos un 95 % y lo más preferentemente el 100 % idéntica a la parte correspondiente de la secuencia de referencia. Como alternativa, el número de emparejamientos incorrectos de un solo nucleótido en relación con la parte de la secuencia de referencia es como máximo tres, preferentemente como máximo dos, más preferentemente como máximo uno y lo más preferentemente cero.

El uso de un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención implica la formación de una región doble entre la totalidad o una parte de la primera cadena y una parte de un ácido nucleico diana. La parte del ácido nucleico diana que forma una región doble con la primera cadena, definida como que comienza con el primer par de bases formado entre la primera cadena y la secuencia diana y que termina con el último par de bases formado entre la primera cadena y la secuencia diana, ambos inclusive, es la secuencia de ácido nucleico diana o simplemente, la secuencia diana. No es necesario que la región doble formada entre la primera cadena y la segunda cadena sea la misma que la región doble formada entre la primera cadena y la secuencia diana. Es decir, la segunda cadena puede tener una secuencia diferente de la secuencia diana; sin embargo, la primera cadena debe poder formar una estructura doble tanto con la segunda cadena como con la secuencia diana, al menos en condiciones fisiológicas.

La complementariedad entre la primera cadena y la secuencia diana puede ser perfecta (sin emparejamientos incorrectos de nucleótidos o nucleótidos adicionales/eliminados en ninguno de los ácidos nucleicos).

La complementariedad entre la primera cadena y la secuencia diana puede no ser perfecta. La complementariedad puede ser de aproximadamente un 70 % a aproximadamente el 100 %. De manera más específica, la complementariedad puede ser de al menos un 70 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % y valores intermedios.

La identidad entre la primera cadena y la secuencia complementaria de la secuencia diana puede variar de aproximadamente un 75 % a aproximadamente el 100 %. De manera más específica, la complementariedad puede ser de al menos un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 % o un 95 % y valores intermedios, siempre que un ácido nucleico sea capaz de reducir o inhibir la expresión de *LPA*.

Un ácido nucleico que tenga una complementariedad inferior al 100 % entre la primera cadena y la secuencia diana puede reducir la expresión de *LPA* al mismo nivel que un ácido nucleico que tiene una complementariedad perfecta entre la primera cadena y la secuencia diana. Como alternativa, puede ser capaz de reducir la expresión de *LPA* a un nivel que es del 15 % al 100 % del nivel de reducción alcanzado por el ácido nucleico con complementariedad perfecta.

5 Los ácidos nucleicos que son capaces de hibridarse en condiciones fisiológicas son ácidos nucleicos que son capaces de formar pares de bases, preferentemente pares de bases de Watson-Crick u oscilantes, entre al menos una parte de los nucleótidos opuestos en las cadenas para formar al menos una región doble. Dicho ácido nucleico bicatenario es preferentemente un ácido nucleico bicatenario estable en condiciones fisiológicas (por ejemplo, en PBS a 37 °C a
10 una concentración de 1 µM de cada cadena), lo que significa que en dichas condiciones, las dos cadenas permanecen hibridadas entre sí. La *T_m* del nucleótido bicatenario es preferentemente de 45 °C o más, preferentemente de 50 °C o más y más preferentemente de 55 °C o más.

15 En algunas realizaciones, la segunda secuencia es capaz de hibridarse con la primera secuencia en condiciones fisiológicas y preferentemente el ácido nucleico es un ARNip que es capaz de inhibir la expresión de *LPA* a través de la ruta de la iARN.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden ser capaces de inhibir la expresión de *LPA*. La inhibición puede ser completa, es decir, 0 % de expresión restante en comparación con el nivel de expresión de *LPA*
20 en ausencia del ácido nucleico de la invención. La inhibición de la expresión de *LPA* puede ser parcial, es decir, puede ser del 15 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o valores intermedios de la expresión de *LPA* en ausencia de un ácido nucleico de la invención. El nivel de inhibición puede medirse mediante la comparación de una muestra tratada con una muestra no tratada o con una muestra tratada con un control tal como, por ejemplo, un ARNip que no se dirige a *LPA*. La inhibición puede medirse mediante la medición
25 de los niveles de proteínas y/o ARNm de *LPA* o de los niveles de un biomarcador o indicador que se correlaciona con la presencia o actividad de *LPA*. Puede medirse en células que se pueden haber tratado *in vitro* con un ácido nucleico descrito en el presente documento. Como alternativa, o además, la inhibición puede medirse en células, tales como hepatocitos, o en tejido, tal como tejido hepático, o en un órgano, tal como el hígado, o en un líquido corporal, tal como sangre, suero o linfa, o en cualquier otra parte del cuerpo que se haya extraído de un sujeto previamente tratado con
30 un ácido nucleico divulgado en el presente documento. Preferentemente, la inhibición de la expresión de *LPA* se determina mediante la comparación del nivel de ARNm de *LPA* medido en células que expresan *LPA* después de 24 o 48 horas de tratamiento *in vitro* en condiciones ideales (véanse los ejemplos para concentraciones y condiciones adecuadas) con un ácido nucleico divulgado en el presente documento con el nivel de ARNm de *LPA* medido en las mismas células que no se trataron o se trataron de forma simulada o se trataron con un ácido nucleico de control.

35 Como se utiliza en el presente documento, el término "inhibir", "regular negativamente" o "reducir" con respecto a la expresión génica significa que la expresión del gen, o el nivel de moléculas de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas (por ejemplo, ARNm), o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas, se reduce por debajo de la observada en ausencia del ácido nucleico o ácido
40 nucleico conjugado de la invención o en referencia a una molécula de ARNip sin homología conocida con los transcritos humanos (en el presente documento denominado control sin silenciamiento). Dicho control puede conjugarse y modificarse de manera análoga a la molécula de la invención y administrarse en la célula diana por la misma vía; por ejemplo, la expresión puede reducirse al 90 %, al 80 %, al 70 %, al 60 %, al 50 %, al 40 %, al 30 %, al 20 %, al 15 % o a valores intermedios o inferiores a los observados en ausencia del ácido nucleico o ácido nucleico conjugado o en
45 presencia de un control sin silenciamiento.

El ácido nucleico puede comprender una primera cadena y una segunda cadena que tienen cada una de 19 a 25 nucleótidos de longitud. La primera cadena y la segunda cadena pueden tener diferentes longitudes.

50 La primera cadena y/o la segunda cadena pueden ser cada una de 19 a 25, preferentemente de 19 nucleótidos de longitud y al menos una región doble puede tener de 19 a 23 nucleótidos de longitud. La región doble puede comprender dos cadenas separadas o puede comprender una sola cadena que comprende la primera cadena y la segunda cadena.

55 La primera cadena puede tener una longitud de 19, 20, 21, 22, 23 o 24 nucleótidos. Lo más preferentemente, la primera cadena tiene 19 nucleótidos de longitud. La segunda cadena puede tener independientemente 19, 20, 21, 22, 23 ó 24 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, la segunda cadena tiene 19 nucleótidos de longitud.

60 El ácido nucleico puede tener una longitud de 23 a 24 pares de nucleótidos. El ácido nucleico puede tener una longitud de 19 a 21 pares de nucleótidos. El ácido nucleico puede tener una longitud de 21 a 23 pares de nucleótidos.

El ácido nucleico puede comprender una región doble que consiste en 19 a 25 pares de bases de nucleótidos. La región doble puede consistir en 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de bases, que pueden ser contiguas. Preferentemente, la región doble consiste en 19 pares de bases.

65 Preferentemente, el ácido nucleico media la interferencia por ARN.

En una realización, el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado como se describe puede reducir la expresión de *LPA* en al menos un 15 % en comparación con la expresión observada en ausencia del ácido nucleico o del ácido nucleico conjugado. En particular, la expresión de *LPA* puede reducirse al menos al siguiente % dado o menos del 90 %, el 80 %, el 70 %, el 60 %, el 50 %, el 40 %, el 30 %, el 20 %, el 15 % o menos, y valores intermedios, que la observada en ausencia del ácido nucleico o ácido nucleico conjugado o en presencia de un control sin silenciamiento.

El ácido nucleico puede tener un saliente en un extremo y un extremo romo en el otro. El ácido nucleico puede tener un saliente en ambos extremos. El ácido nucleico puede tener extremos romos en ambos extremos. El ácido nucleico puede tener extremos romos en el extremo con el extremo 5' de la primera cadena y el extremo 3' de la segunda cadena o en el extremo 3' de la primera cadena y el extremo 5' de la segunda cadena.

Un "saliente", como se utiliza en el presente documento, tiene su significado normal y habitual en la materia, es decir, una parte monocatenaria de un ácido nucleico que se prolonga más allá del nucleótido terminal de una cadena complementaria en un ácido nucleico bicatenario. La expresión "extremo romo" incluye ácido nucleico bicatenario por el que ambas cadenas terminan en la misma posición, independientemente de si el nucleótido o los nucleótidos terminales se emparejan por las bases. El nucleótido terminal de una primera cadena y de una segunda cadena en un extremo romo puede estar emparejado por la base. El nucleótido terminal de una primera cadena y de una segunda cadena en un extremo romo puede no estar emparejado. Los dos nucleótidos terminales de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden estar emparejados por las bases. Los dos nucleótidos terminales de una primera cadena y una segunda cadena en un extremo romo pueden no estar emparejados.

El ácido nucleico puede comprender un saliente en un extremo 3' o 5'. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la primera cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la primera cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la primera cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente tanto en el extremo 5' como en el extremo 3' de la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la primera cadena y un saliente en 3' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la primera cadena y un saliente en 5' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 3' en la primera cadena y un saliente en 3' en la segunda cadena. El ácido nucleico puede tener un saliente en 5' en la primera cadena y un saliente en 5' en la segunda cadena.

Un saliente en el extremo 3' o 5' de la segunda cadena o la primera cadena puede seleccionarse entre 1, 2, 3, 4 y 5 nucleótidos de longitud. Opcionalmente, un saliente puede consistir en 1 o 2 nucleótidos, que pueden estar modificados o no.

Preferentemente, el ácido nucleico es un ARNip. Los ARNip son ARN de interferencia pequeños o de silenciamiento pequeños que pueden inhibir la expresión de un gen diana a través de la ruta de la interferencia por ARN (iARN). La inhibición ocurre a través de la degradación dirigida de las transcripciones de ARNm del gen diana después de la transcripción. El ARNip forma parte del complejo RISC. El complejo RISC se dirige específicamente al ARN diana mediante la complementariedad de secuencia de la primera cadena (antisentido) con la secuencia diana.

Preferentemente, el ácido nucleico media la interferencia por ARN (iARN). El ácido nucleico, o al menos la primera cadena del ácido nucleico, puede, por lo tanto, incorporarse preferentemente en el complejo RISC. Como resultado, el ácido nucleico, o al menos la primera cadena del ácido nucleico, es, por lo tanto, capaz de guiar el complejo RISC a un ARN diana específico con el que el ácido nucleico, o al menos la primera cadena del ácido nucleico, es al menos parcialmente complementario. Después, el complejo RISC escinde de manera específica este ARN diana y, como resultado, provoca la inhibición de la expresión del gen del que procede el ARN.

50 Modificaciones del ácido nucleico

Los polinucleótidos sin modificar, en particular los ribonucleótidos, pueden ser propensos a la degradación por nucleasas celulares, y, como tal, pueden utilizarse modificaciones/nucleótidos modificados. Dichas modificaciones pueden ayudar a estabilizar el ácido nucleico haciéndolo más resistente a las nucleasas. Esta resistencia mejorada permite que los ácidos nucleicos sean activos en la mediación de la interferencia por ARN durante períodos de tiempo más prolongados y, en especial, es deseable cuando los ácidos nucleicos se van a utilizar para un tratamiento.

En general, las modificaciones de los ácidos nucleicos proporcionan una herramienta poderosa para superar las posibles limitaciones que incluyen, pero sin limitación, la estabilidad *in vitro* e *in vivo*, y la biodisponibilidad inherente a las moléculas de ARN nativas. Los ácidos nucleicos pueden modificarse mediante modificaciones químicas. El ácido nucleico modificado también puede minimizar la posibilidad de inducir actividad interferón en seres humanos. La modificación puede potenciar adicionalmente la entrega funcional de un ácido nucleico a una célula diana. Un ribonucleótido puede comprender una modificación química de la base, el azúcar o los restos fosfato. El ácido ribonucleico puede modificarse mediante sustitución o inserción con análogos de ácidos nucleicos o bases.

Los nucleótidos modificados pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en un nucleótido de desoxitimina (dT)

del extremo 3', un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, un nucleótido modificado con 2', un nucleótido modificado con 2'-desoxi, un nucleótido bloqueado, un nucleótido abásico, un nucleótido modificado con 2'-amino, un nucleótido modificado con 2'-alquilo, un nucleótido de morfolino, un fosforoamidato, un nucleótido de base no natural, un nucleótido que comprende un grupo 5'-fosforotioato, un nucleótido que comprende un fosfato en 5' o mimético de fosfato en 5' y un nucleótido terminal unido a un derivado de colesterilo o un grupo bisdecilamida del ácido dodecanoico.

Los ácidos nucleicos pueden comprender un nucleótido que comprende un nucleótido modificado, en donde la base se selecciona entre 2-aminoadenosina, 2,6-diaminopurina, inosina, piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetoxibenceno, 3-metiluracilo, dihidouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolidina (por ejemplo, 5-metilcitolidina), 5-alquiluridina (por ejemplo, ribotimidina), 5-halouridina (por ejemplo, 5-bromouridina), 6-azapirimidina, 6-alquilpirimidina (por ejemplo, 6-metiluridina), propina, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wibutosina, wybutoxosina, 4-acetilcitolidina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, β-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosa, 3-metilcitolidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosa, N6-metiladenosina, 7-metilguanosa, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, β-D-manosilqueosina, ácido uridina-5-oxiacético y 2-tiocitolidina.

Los ácidos nucleicos que se analizan en el presente documento incluyen ARN sin modificar así como ARN que se ha modificado, por ejemplo, para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósido. El ARN sin modificar se refiere a una molécula en la que los componentes del ácido nucleico, en concreto, azúcares, bases y restos fosfato, son iguales o esencialmente iguales a los que se producen en la naturaleza, por ejemplo, los que se producen de forma natural en el cuerpo humano. El nucleótido modificado como se describe en el presente documento se refiere a un nucleótido en el que uno o más de los componentes del ácido nucleico, en concreto, azúcares, bases y restos fosfato, son diferentes de aquellos que se producen en la naturaleza. Aunque se les denomina nucleótidos modificados, por supuesto, debido a la modificación, el término también incluye moléculas que no son nucleótidos, por ejemplo, una molécula polinucleotídica en las que la cadena principal de ribofosfato se reemplaza por una construcción sin ribofosfato que permite la hibridación entre cadenas, es decir, los nucleótidos modificados imitan la cadena principal de ribofosfato.

Muchas de las modificaciones que se describen a continuación que se producen dentro de un ácido nucleico se repetirán dentro de una molécula de polinucleótido, tal como una modificación de una base, un resto fosfato o un O no enlazante de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones/nucleótidos posibles en el polinucleótido, pero en muchos casos no se producirá. Una modificación solo puede producirse en una posición terminal en 3' o 5', solo puede producirse en regiones terminales, tal como en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de una cadena. Una modificación puede producirse en una región bicatenaria, una región monocatenaria o en ambas. Una modificación puede producirse solo en la región bicatenaria de un ácido nucleico o puede producirse solo en una región monocatenaria de un ácido nucleico. Una modificación con fosforotioato en una posición O no enlazante puede producirse solo en uno o en ambos extremos, puede producirse solo en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4 o 5 nucleótidos de una cadena, o puede producirse en regiones dobles y/o monocatenarias, en particular en los extremos. El extremo 5' o los extremos 3' pueden estar fosforilados.

La estabilidad de un ácido nucleico puede aumentarse incluyendo bases particulares en salientes o incluir nucleótidos modificados, en salientes monocatenarios, por ejemplo, en un saliente en 5' o 3', o en ambos. Los nucleótidos de purina pueden incluirse en salientes. Todas o algunas de las bases en un saliente en 3' o 5' pueden modificarse. Las modificaciones pueden incluir el uso de modificaciones en el grupo 2'-OH del azúcar ribosa, el uso de desoxirribonucleótidos, en lugar de ribonucleótidos, y modificaciones en el grupo fosfato, tales como modificaciones de fosforotioato. No es necesario que los salientes sean homólogos con la secuencia diana.

Las nucleasas pueden hidrolizar enlaces fosfodiéster de ácido nucleico. Sin embargo, las modificaciones químicas de los ácidos nucleicos pueden conferir propiedades mejoradas y pueden hacer que los oligorribonucleótidos sean más estables a las nucleasas.

Los términos reemplazo, modificación y alteración indican una diferencia con respecto a una molécula de origen natural.

Se analizan modificaciones específicas con más detalle a continuación.

Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no enlazantes reemplazados por azufre. Uno, cada uno o los dos oxígenos no enlazantes en el grupo fosfato pueden ser independientemente uno cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo).

El enlazador de fosfato también puede modificarse mediante reemplazo de un oxígeno enlazante por nitrógeno

(fosforamidatos puenteados), azufre (fosforotioatos puenteados) y carbono (fosfonatos de metileno puenteados). El reemplazo puede producirse en un oxígeno terminal. Es posible reemplazar los oxígenos no enlazantes por nitrógeno.

5 Un nucleótido modificado puede incluir la modificación de los grupos de azúcar. El grupo 2' hidroxilo (OH) puede modificarse o reemplazarse por varios sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes.

10 Los ejemplos de modificaciones "oxi"-grupo 2' hidroxilo incluyen alcoxi o ariloxi (OR, por ejemplo, R=H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$; los ácidos nucleicos "bloqueados" (ANB) en los que el 2' hidroxilo se conecta, por ejemplo, mediante un puente de metileno, con el 4' carbono del mismo azúcar ribosa; O-AMINA (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino) y aminoalcoxi, $O(CH_2)_nAMINA$, (por ejemplo, AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino, etilendiamina, poliamino).

15 Las modificaciones "desoxi" incluyen hidrógeno, halógeno, amino (por ejemplo, NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino o aminoácido); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINA$ (AMINA = NH_2 ; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino o diheteroarilamino), $-NHC(O)R$ (R = alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquiltio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alquenilo y alquinilo, que pueden estar opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, una funcionalidad amino. Otros sustituyentes de determinadas realizaciones incluyen 2'-metoxietilo, 2'-OCH₃, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo y 2'-fluro.

25 El grupo azúcar también puede contener uno o más carbonos que posean la configuración estereoquímica opuesta a la del carbono correspondiente en la ribosa. Por lo tanto, un nucleótido modificado puede contener un azúcar tal como arabinosa.

30 Los nucleótidos modificados también pueden incluir azúcares "abásicos", que carecen de una nucleobase en C-1'. Estos azúcares abásicos pueden contener además modificaciones en uno o más de los átomos de azúcar constituyentes.

Las modificaciones de 2' pueden usarse en combinación con una o más modificaciones del enlazador de fosfato (por ejemplo, fosforotioato).

35 Los grupos fosfato pueden reemplazarse de manera individual por enlazadores que no contengan fósforo.

Los ejemplos de restos que pueden reemplazar el grupo fosfato incluyen siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, enlazador de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilénimino, metilénmetilimino, metilénhidrazo, metiléndimetilhidrazo y metilénoximetilimino. En determinadas realizaciones, los reemplazos pueden incluir los grupos metilencarbonilamino y metilénmetilimino.

40 El enlazador de fosfato y el azúcar ribosa pueden reemplazarse por nucleótidos resistentes a nucleasas.

Los ejemplos incluyen los sustitutos de nucleósido morfolino, ciclobutilo, pirrolidina y ácido nucleico peptídico (ANP).

45 Los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden modificarse. Dichas modificaciones pueden estar en el extremo 3' o el extremo 5' o en ambos extremos de la molécula. Pueden incluir la modificación o el reemplazo de un fosfato terminal completo o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden conjugarse con otras entidades moleculares funcionales tales como restos de marcado, por ejemplo, fluoróforos (por ejemplo, pireno, TAMRA, fluoresceína, colorantes Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados, por ejemplo, en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales pueden unirse al azúcar a través de un grupo fosfato y/o un enlazador. El átomo terminal del enlazador puede conectarse a o reemplazar el átomo de enlace del grupo fosfato o el grupo O, N, S o C C-3' o C-5' del azúcar. Como alternativa, el enlazador puede conectarse a o reemplazar el átomo terminal de un sustituto de nucleótido (por ejemplo, ANP). Estos espaciadores o enlazadores pueden incluir, por ejemplo, $-(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nN-$, $-(CH_2)_nO-$, $-(CH_2)_nS-$, $-(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2O-$ (por ejemplo, n = 3 o 6), azúcares abásicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oxiiimina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida o morfolino, o reactivos de biotina y fluoresceína. El extremo 3' puede ser un grupo -OH.

60 Otros ejemplos de modificaciones terminales incluyen colorantes, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticulantes (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales, EDTA, vehículos lipófilos (por ejemplo, colesterol, ácido cólico, ácido adamantano acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-Bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geranilohehexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxazina) y conjugados peptídicos (por ejemplo, péptido antenapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores de transporte/absorción (por ejemplo, aspirina,

vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, grupos imidazol, conjugados acridina-imidazol, complejos Eu^{3+} de tetraazamacrociclos).

5 Pueden añadirse modificaciones terminales por una serie de razones, que incluyen modular la actividad o modular la resistencia a la degradación. Las modificaciones terminales útiles para modular la actividad incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. Los ácidos nucleicos en la primera o la segunda cadena, pueden estar fosforilados en 5' o incluir un análogo de fosforilo en el extremo 5' principal. Las modificaciones con 5'-fosfato incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-5')$; 5'-difosfato $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; 5'-trifosfato $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-\text{P}(\text{HO})(\text{O})-\text{O}-5')$; caperuza de 5'-guanósina (7-metilada o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); caperuza de 5'-adenósina (Appp) y cualquier estructura de caperuza de nucleótido modificada o sin modificar (NO-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosfortioato; $(\text{HO})_2(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-monoditiofosfato (fosforditioato; $(\text{HO})(\text{HS})(\text{S})\text{P}-\text{O}-5'$); 5'-fosfortiolato $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{S}-5')$; cualquier combinación adicional de monofosfato, difosfato y trifosfato sustituidos por oxígeno/azufre (por ejemplo, 5'- α -tiorifosfato, 5'- γ -tiorifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos $((\text{HO})_2(\text{O})\text{P}-\text{NH}-5'$, $(\text{HO})(\text{NH}_2)(\text{O})\text{P}-\text{O}-5'$), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., por ejemplo, $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$, $(\text{OH})_2(\text{O})\text{P}-5'-\text{CH}_2-$), 5'-vinilfosfonato, 5'-alquiléterfosfonatos (R = alquiléter = metoximetilo (MeOCH_2-), etoximetilo, etc., por ejemplo, $\text{RP}(\text{OH})(\text{O})-\text{O}-5'$).

20 Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para controlar la distribución y en dichos casos los grupos que han de añadirse pueden incluir fluoróforos, por ejemplo, fluoresceína o un colorante Alexa. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para potenciar la captación, las modificaciones útiles para esto incluyen el colesterol. Las modificaciones terminales también pueden ser útiles para reticular un agente de ARN con otro resto.

25 La adenina, la guanina, la citosina y el uracilo son las bases más comunes que se encuentran en el ARN. Estas bases pueden modificarse o reemplazarse para proporcionar ARN que tengan propiedades mejoradas. Por ejemplo, pueden prepararse oligorribonucleótidos resistentes a nucleasas con estas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (por ejemplo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubarina, isoguanisina o tubercidina) y una cualquiera de las modificaciones anteriores. Como alternativa, pueden emplearse análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases anteriores y "bases universales". Los ejemplos incluyen 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, 5-amino alil uracilo, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo, hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos, 7-metilguanina, pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-deaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, 5-alquilocitosina, 7-desazaadenina, N6,N6-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N3-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxycarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxycarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N<4>-acetilcitosina, 2-tiocitosina, N6-metiladenina, N6-isopentiladenina, 2-metil-N6-isopentiladenina, N-metilguaninas o bases O-alquiladas.

45 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "análogo de nucleótido no emparejado" significa un análogo de nucleótido que incluye un resto de emparejamiento que no es una base que incluye, pero sin limitación: 6-des amino adenosina (Nubularina), 4-Me-indol, 3-nitropirrol, 5-nitroindol, Ds, Pa, N3-Me ribo U, N3-Me riboT, N3-Me dC, N3-Me-dT, N1-Me-dG, N1-Me-dA, N3-metil-dC, N3-Me dC. Un análogo de nucleótido sin emparejamiento de bases puede ser un ribonucleótido. Como alternativa, puede ser un desoxirribonucleótido.

50 Como se utiliza en el presente documento, la expresión "grupo funcional terminal" incluye, sin limitación, los grupos halógeno, alcohol, amina, carboxílico, éster, amida, aldehído, cetona y éter.

55 Determinados restos pueden estar enlazados al extremo 5' de la primera cadena o de la segunda cadena. Estos incluyen un resto de ribosa abásica, un resto desoxirribosa abásica, modificaciones de ribosa abásica y restos desoxirribosa abásica que incluyen modificaciones con 2' O alquilo; restos de ribosa abásica invertida y desoxirribosa abásica y modificaciones de los mismos, C6-imino-Pi; un nucleótido espejo que incluye L-ADN y L-ARN; nucleótido de 5'OMe; y análogos de nucleótidos que incluyen nucleótido de 4',5'-metileno; 1-(β -D-eritrofuranosil)nucleótido; 4'-tio nucleótido, nucleótido carbocíclico; fosfato de 5'-amino-alquilo; fosfato de 1,3-diamino-2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo; fosfato de 6-aminohexilo; fosfato de 12-aminododecilo; fosfato de hidroxipropilo; nucleótido de 1,5-anhidrohexitol; α -nucleótido; nucleótido de treo-pentofuranosilo; 3',4'-seco nucleótido acíclico; nucleótido de 3,4-dihidroxibutilo; nucleótido de 3,5-dihidroxipentilo, resto abásico invertido 5'-5'; fosfato de 1,4-butanodiol; 5'-amino; y metilfosfonato de unión y no de unión y restos 5'-mercapto.

65 El término "abásico", como se usa en el presente documento, se refiere a restos que carecen de una base o que tienen otros grupos químicos en lugar de una base en la posición 1', por ejemplo, un derivado de ribosa desoxiabásico unido 3',3' o unido 5',5'.

En una realización, en el caso de una primera y una segunda cadena parcialmente complementarias, el nucleótido en

la segunda cadena que "corresponde a" una posición en la primera cadena puede no formar necesariamente un par de bases si esa posición es la posición en la que hay un emparejamiento incorrecto.

Se prefiere una primera y una segunda cadena que sean completamente complementarias en la región doble (ignorando cualquier región sobresaliente) y que no haya emparejamientos incorrectos en de la región bicatenaria del ácido nucleico.

Una ventaja de un ácido nucleico de acuerdo con la invención es que comprende relativamente pocos nucleótidos modificados de origen no natural pero, no obstante, es capaz de inhibir de manera eficaz el gen diana durante largos periodos de tiempo. Dicho ácido nucleico es más fácil de sintetizar que los ácidos nucleicos correspondientes con más nucleótidos de origen no natural (modificados 2'F).

Los ácidos nucleicos pueden incluir uno o más nucleótidos invertidos, por ejemplo, timidina invertida o adenina invertida (por ejemplo, véase Takei *et al.*, 2002. JBC 277 (26):23800-06).

Los ácidos nucleicos pueden comprender un nucleótido de ARN invertido en uno o varios de los extremos de la cadena. Dichos nucleótidos invertidos proporcionan estabilidad al ácido nucleico.

Ligandos

El ácido nucleico de la invención puede conjugarse con un ligando. La administración eficaz de oligonucleótidos, en particular de ácidos nucleicos bicatenarios de la invención, a células *in vivo* es importante y requiere un direccionamiento específico y una protección sustancial del ambiente extracelular, en particular de las proteínas del suero. Un método para lograr un direccionamiento específico es conjugar un ligando con el ácido nucleico. El ligando ayuda a dirigir el ácido nucleico al sitio diana necesario. Existe una necesidad de conjugar ligandos adecuados para las moléculas receptoras deseadas con el fin de que las células diana absorban las moléculas conjugadas mediante mecanismos tales como diferentes rutas de endocitosis mediadas por receptores o procesos funcionalmente análogos.

Un ejemplo es el complejo del receptor de asialoglucoproteína (ASGP-R, del inglés *asialoglycoprotein receptor*) compuesto por proporciones variables de multímeros de los receptores de membrana ASGR1 y ASGR2, que es muy abundante en los hepatocitos y tiene una gran afinidad por el resto GalNAc descrito en el presente documento. Una de las primeras divulgaciones del uso de glucósidos de grupos triantenarios como ligandos conjugados fue en la patente estadounidense número US 5.885.968. Los conjugados que tienen tres ligandos GalNAc y que comprenden grupos fosfato se conocen y se describen en Dubber *et al.* (Bioconjug. Chem. enero-febrero de 2003; 14(1):239-46). El complejo del ASGP-R muestra una afinidad 50 veces mayor por la N-acetil-D-galactosilamina (GalNAc) que por la D-Gal.

El complejo del receptor de asialoglucoproteína (ASGP-R), que reconoce de manera específica subunidades de β -galactosilo terminales de proteínas glucosiladas u otros oligosacáridos (Weigel, P. H. *et al.*, Biochim. Biophys. Acta. 19 de septiembre de 2002;1572(2-3):341-63), se puede utilizar para administrar un fármaco a los hepatocitos del hígado que expresan el complejo del receptor mediante el acoplamiento covalente de galactosa o galactosamina a la sustancia farmacológica (Ishibashi, S.; *et al.*, J Biol. Chem. 11 de noviembre de 1994; 269(45):27803-6). Además, la afinidad de unión puede aumentarse significativamente por el efecto de valencia múltiple, que se logra mediante la repetición del resto de direccionamiento (Biessen E. A. *et al.*, J Med Chem. 28 de abril de 1995; 38(9):1538-46).

El complejo del ASGP-R es un mediador para una captación activa de glucoproteínas que contienen β -galactosilo terminal en los endosomas de la célula. Por lo tanto, el ASGPR es muy adecuado para la administración dirigida de candidatos a fármacos conjugados con dichos ligandos como, por ejemplo, ácidos nucleicos en células que expresan receptores (Akinc *et al.*, Mol Ther. Julio de 2010; 18(7):1357-64).

De manera más general, el ligando puede comprender un sacárido que se selecciona para que tenga afinidad por al menos un tipo de receptor en una célula diana. En particular, el receptor está en la superficie de una célula hepática de mamífero, por ejemplo, el complejo del receptor de asialoglucoproteína (ASGP-R) hepática descrito antes.

El sacárido puede seleccionarse entre N-acetil galactosamina, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fucosa. El sacárido puede ser N-acetil galactosamina (GalNAc).

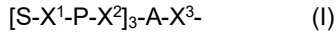
Por lo tanto, un ligando para su uso en la presente invención puede comprender (i) uno o más restos de N-acetil galactosamina (GalNAc) y derivados de la misma, y (ii) un enlazador, en donde el enlazador conjuga los restos de GalNAc con una secuencia como se define en el presente documento. El enlazador puede ser una estructura ramificada bivalente, trivalente o tetravalente. Los nucleótidos pueden modificarse como se define en el presente documento.

"GalNAc" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranososa, habitualmente denominada en la bibliografía N-acetil galactosamina. La referencia a "GalNAc" o a "N-acetil galactosamina" incluye tanto la forma β : 2-(Acetilamino)-2-desoxi- β -D-galactopiranososa, como la forma α : 2-(Acetilamino)-2-desoxi- α -D-galactopiranososa. Tanto la forma β : 2-

(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranososa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranososa pueden utilizarse indistintamente. Preferentemente, los compuestos de la invención comprenden la forma β, 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranososa.

5 Por lo tanto, el ligando puede comprender GalNAc.

El ligando puede comprender un compuesto de fórmula (I):



10 en donde:

S representa un sacárido, en donde el sacárido es N-acetil galactosamina;

X¹ representa alquileo C₃-C₆ o (-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂- en donde m es 1, 2 o 3;

P es un fosfato o fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato);

X² es alquileo o un éter de alquileo de fórmula (-CH₂)_n-O-CH₂- donde n = 1 a 6;

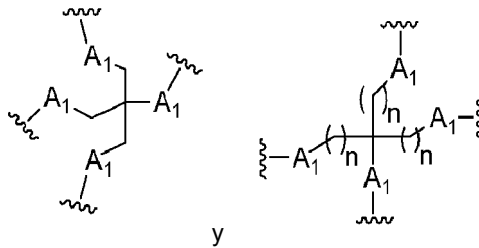
A es una unidad de ramificación;

X³ representa una unidad de unión;

en donde un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está conjugado con X³ a través de un fosfato o fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato).

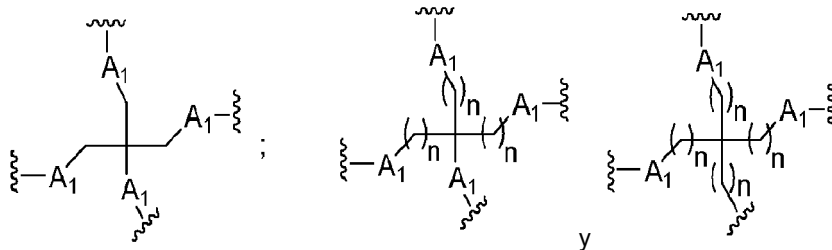
En la fórmula (I), la unidad de ramificación "A" se ramifica en tres con el fin de acomodar los tres ligandos sacarídicos. La unidad de ramificación se une de manera covalente a las partes ancladas restantes del ligando y el ácido nucleico. La unidad de ramificación puede comprender un grupo alifático ramificado que comprende grupos seleccionados entre los grupos alquilo, amida, disulfuro, polietilenglicol, éter, tioéter e hidroxiamino. La unidad de ramificación puede comprender grupos seleccionados entre grupos alquilo y éter.

La unidad de ramificación A puede tener una estructura seleccionada entre:



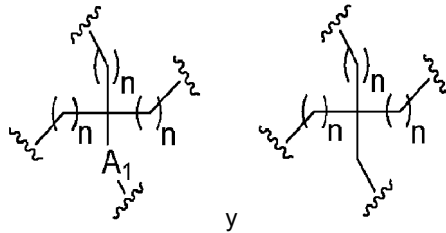
30 en donde cada A₁ representa independientemente O, S, C=O o NH; y cada n representa independientemente un número entero de 1 a 20.

35 La unidad de ramificación puede tener una estructura seleccionada entre:



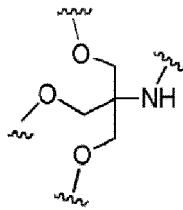
40 en donde cada A₁ representa independientemente O, S, C=O o NH; y cada n representa independientemente un número entero de 1 a 20.

La unidad de ramificación puede tener una estructura seleccionada entre:

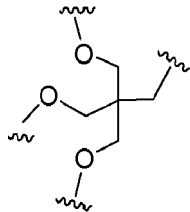


en donde A_1 es O, S, C=O o NH; y cada n representa independientemente un número entero de 1 a 20.

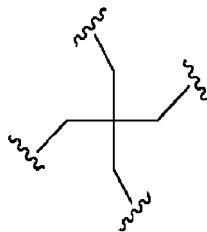
- 5 La unidad de ramificación puede tener la estructura:



- 10 La unidad de ramificación puede tener la estructura:



- 15 La unidad de ramificación puede tener la estructura:



Opcionalmente, la unidad de ramificación consiste en solo un átomo de carbono.

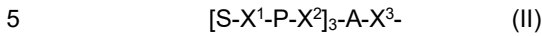
- 20 La parte "X³" es una unidad de unión. La unidad de unión es lineal y se une covalentemente a la unidad de ramificación y al ácido nucleico.

- 25 X³ se puede seleccionar de alquileno C₁-C₂₀, alquenileno C₂-C₂₀-, un éter de alquileno de fórmula -(alquileno C₁-C₂₀)-O-(alquileno C₁-C₂₀)-, -C(O)-alquileno C₁-C₂₀-, -alquileno C₀-C₄(Cy)alquileno C₀-C₄- en donde Cy representa un anillo cicloalquileno, arileno, heterocíclico o heteroarileno sustituido o sin sustituir de 5 o 6 miembros, -alquileno C₁-C₄-NHC(O)-alquileno C₁-C₄-, -alquileno C₁-C₄-C(O)NH-alquileno C₁-C₄-, -alquileno C₁-C₄-SC(O)-alquileno C₁-C₄-, -alquileno C₁-C₄-C(O)S-alquileno C₁-C₄-, -alquileno C₁-C₄-OC(O)-alquileno C₁-C₄-, -alquileno C₁-C₄-C(O)O-alquileno C₁-C₄- y -alquileno C₁-C₆-S-S-alquileno C₆-C₆-.

- 30 X³ puede ser un éter de alquileno de fórmula -(alquileno C₁-C₂₀)-O-(alquileno C₁-C₂₀)-. X³ puede ser un éter de alquileno de fórmula -(alquileno C₁-C₂₀)-O-(alquileno C₄-C₂₀)-, en donde dicho (alquileno C₄-C₂₀) se une a Z. X³ puede seleccionarse entre el grupo que consiste en -CH₂-O-C₃H₆-, -CH₂-O-C₄H₈-, -CH₂-O-C₆H₁₂- y H₂-O-C₈H₁₆-, en especial

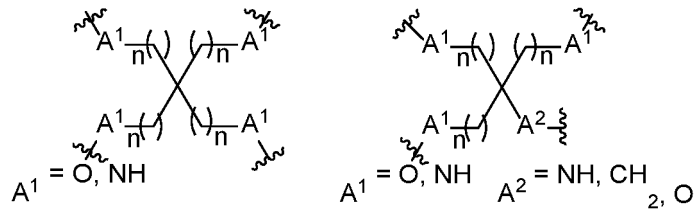
-CH₂-O-C₄H₈-, -CH₂-O-C₆H₁₂- y H₂-O-C₈H₁₆-, en donde en cada caso el grupo -CH₂- se une a A.

El ligando puede comprender un compuesto de fórmula (II):



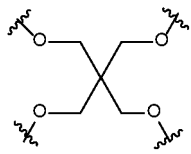
en donde:

- 10 S representa un sacárido;
 X¹ representa alquileo C₃-C₆ o (-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂- en donde m es 1, 2 o 3;
 P es un fosfato o fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato);
 X² es alquileo C₁-C₈;
 A es una unidad de ramificación seleccionada de:

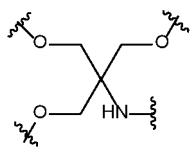


- 20 n = 1 a 4 n = 1 a 4 X³ es una unidad de unión;
 en donde un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención está conjugado con X³ a través de un fosfato o fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato)

La unidad de ramificación A puede tener la estructura:



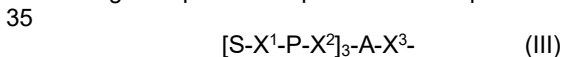
La unidad de ramificación A puede tener la estructura:



en donde X³ se une al átomo de nitrógeno.

X³ puede ser alquileo C₁-C₂₀. Preferentemente, X³ se selecciona entre el grupo que consiste en -C₃H₆-, -C₄H₈-, -C₆H₁₂- y -C₈H₁₆-, en especial -C₄H₈-, -C₆H₁₂- y -C₈H₁₆-.

El ligando puede comprender un compuesto de fórmula (III):



en donde:

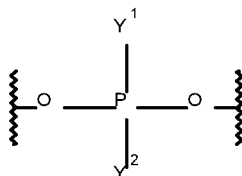
- 40 S representa un sacárido;
 X¹ representa alquileo C₃-C₆ o (-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂- en donde m es 1, 2 o 3;
 P es un fosfato o fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato);
 X² es un éter de alquileo de fórmula -C₃H₆-O-CH₂-;
 A es una unidad de ramificación;
 45 X³ es un éter de alquileo de fórmula seleccionada del grupo que consiste en -CH₂-O-CH₂-, -CH₂-O-C₂H₄-, -CH₂-O-C₃H₆-, -CH₂-O-C₄H₈-, -CH₂-O-C₅H₁₀-, -CH₂-O-C₆H₁₂-, -CH₂-O-C₇H₁₄- y -CH₂-O-C₈H₁₆-, en donde en cada caso el grupo -CH₂- se une a A,

y en donde X³ se conjuga con un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención mediante un fosfato o fosfato modificado (preferentemente un tiofosfato).

La unidad de ramificación puede comprender carbono. Preferentemente, la unidad de ramificación es carbono.

5 X³ puede seleccionarse entre el grupo que consiste en -CH₂-O-C₄H₈-, -CH₂-O-C₅H₁₀-, -CH₂-O-C₆H₁₂-, -CH₂-O-C₇H₁₄- y -CH₂-O-C₈H₁₆-. Preferentemente, X³ se selecciona entre el grupo que consiste en -CH₂-O-C₄H₈-, -CH₂-O-C₆H₁₂- y -CH₂-O-C₈H₁₆-.

10 En algunas realizaciones, cuando P representa un grupo fosfato modificado, P se puede representar por:



15 en donde Y¹ e Y² representan cada uno independientemente =O, =S, -O⁻, -OH, -SH, -BH₃, -OCH₂CO₂, -OCH₂CO₂R^x, -OCH₂C(S)OR^x y -OR^x, en donde R^x representa alquilo C₁-C₆ y en donde



indica unión al resto del compuesto.

20 Por fosfato modificado se entiende un grupo fosfato en donde se reemplaza uno o más de los oxígenos que no se unen. Los ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosfortioato, fosforoselenatos, fosfatos de borano, ésteres de fosfato de borano, fosfonatos de hidrógeno, fosforamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfotriésteres. Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no enlazantes reemplazados por azufre. Uno, cada uno o los dos oxígenos no enlazantes en el grupo fosfato pueden ser independientemente uno cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo).

25 El fosfato también se puede modificar mediante el reemplazo de un oxígeno enlazante por nitrógeno (fosforamidatos puentes), azufre (fosfortioatos puentes) y carbono (fosfonatos de metileno puentes). El reemplazo puede producirse en un oxígeno terminal. Es posible reemplazar los oxígenos no enlazantes por nitrógeno.

Por ejemplo, Y¹ puede representar -OH e Y² puede representar =O o =S; o

35 Y¹ puede representar -O⁻ e Y² puede representar =O o =S;
Y¹ puede representar =O e Y² puede representar -CH₃, -SH, -OR^x o -BH₃
Y¹ puede representar =S e Y² puede representar -CH₃, OR^x o -SH.

El experto en la materia comprenderá que en determinados casos habrá deslocalización entre Y¹ e Y².

40 Preferentemente, el grupo fosfato modificado es un grupo tiofosfato. Los grupos tiofosfato incluyen bitiofosfato (es decir, donde Y¹ representa =S e Y² representa -S⁻) y monotiofosfato (es decir, donde Y¹ representa -O⁻ e Y² representa =S, o donde Y¹ representa =O e Y² representa -S⁻). Preferentemente, P es un monotiofosfato. Los inventores han descubierto que los conjugados que tienen grupos tiofosfato en reemplazo de los grupos fosfato tienen una potencia y duración de la acción *in vivo* mejoradas.

45 P también puede ser un fosfato de etilo (es decir, donde Y¹ representa =O e Y² representa OCH₂CH₃).

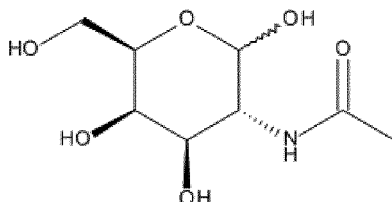
50 El sacárido puede seleccionarse para que tenga una afinidad por al menos un tipo de receptor en una célula diana. En particular, el receptor está en la superficie de una célula hepática de mamífero, por ejemplo, el complejo del receptor hepático de asialoglicoproteína (ASGP-R).

55 Para cualquiera de las realizaciones anteriores, el sacárido se puede seleccionar de N-acetil con uno o más de galactosamina, manosa, galactosa, glucosa, glucosamina y fructosa. Normalmente, un ligando para usar en la presente invención puede incluir N-acetil galactosamina (GalNAc). Preferentemente, los compuestos de la invención pueden tener 3 ligandos, cada uno de los cuales incluirá preferentemente N-acetil galactosamina.

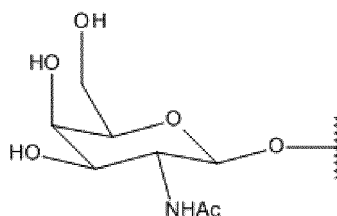
"GalNAc" se refiere a 2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranos, habitualmente denominada en la bibliografía N-acetil galactosamina. La referencia a "GalNAc" o a "N-acetil galactosamina" incluye tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-

2-desoxi-β-D-galactopiranososa, como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranososa. En determinadas realizaciones, tanto la forma β: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranososa como la forma α: 2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranososa pueden utilizarse indistintamente. Preferentemente, los compuestos de la invención comprenden la forma β, 2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranososa.

5

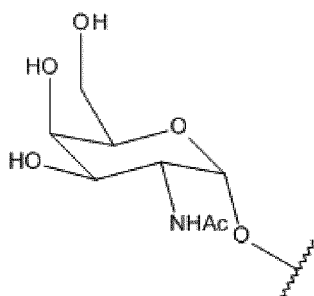


2-(Acetilamino)-2-desoxi-D-galactopiranososa



10

2-(Acetilamino)-2-desoxi-β-D-galactopiranososa



15

2-(Acetilamino)-2-desoxi-α-D-galactopiranososa

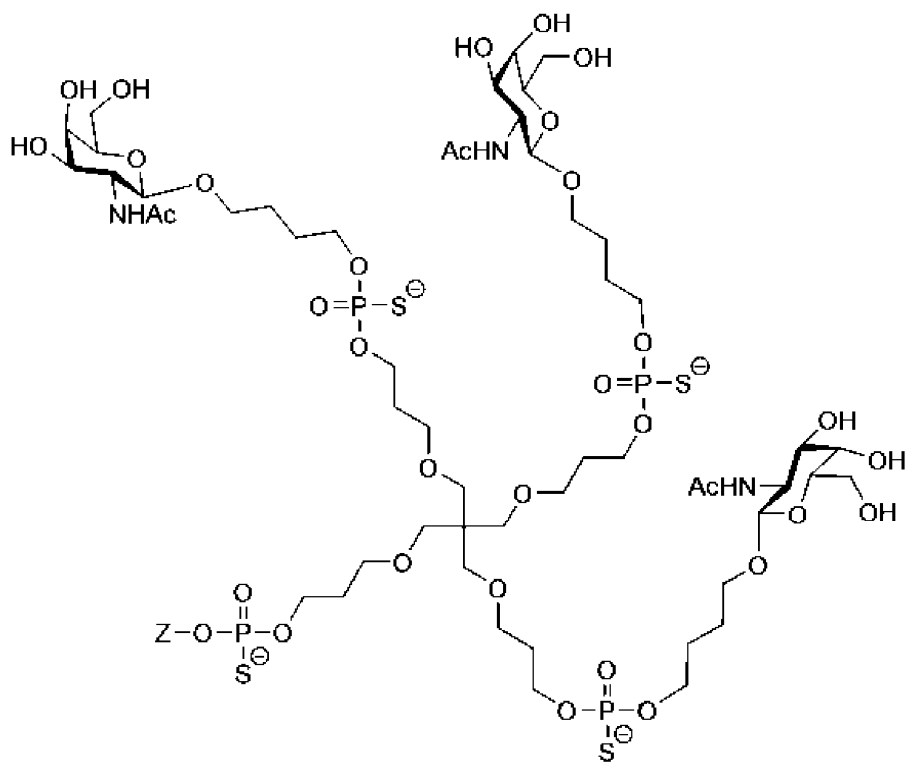
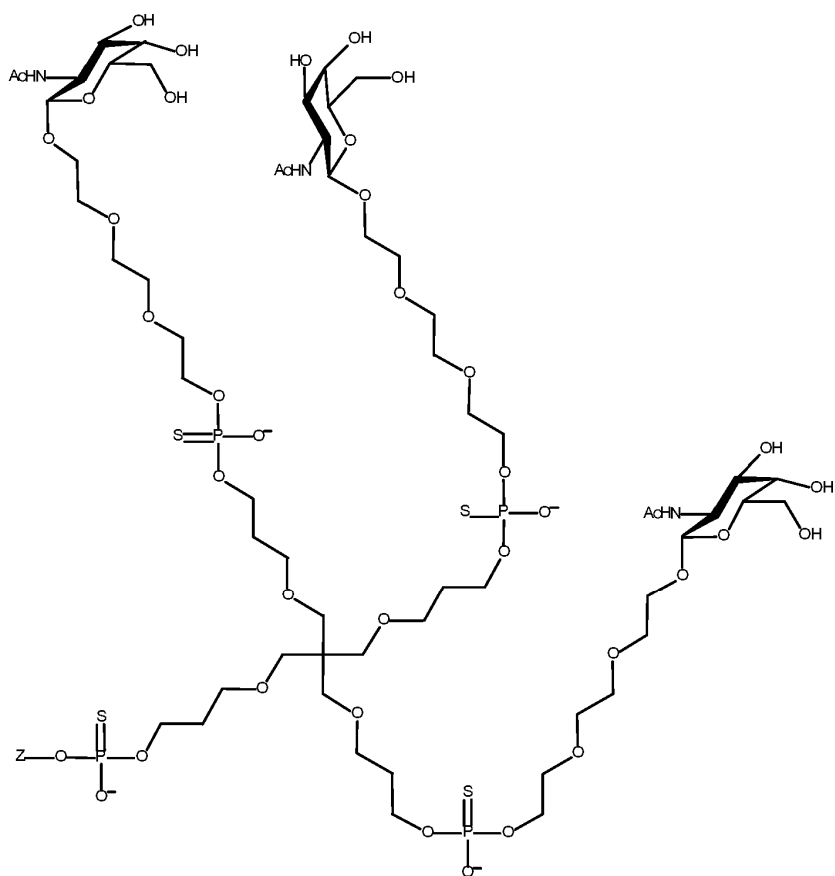
Para cualquiera de los compuestos anteriores de fórmula (III), X¹ puede ser (-CH₂-CH₂-O)(-CH₂)₂-. X¹ puede ser (-CH₂-CH₂-O)₂(-CH₂)₂-. X¹ puede ser (-CH₂-CH₂-O)₃(-CH₂)₂-. Preferentemente, X¹ es (-CH₂-CH₂-O)₂(-CH₂)₂-. Como alternativa, X¹ representa alquileo C₃-C₆. X¹ puede ser propileno. X¹ puede ser butileno. X¹ puede ser pentileno. X¹ puede ser hexileno. Preferentemente, el alquilo es un alquileo lineal. En particular, X¹ puede ser butileno.

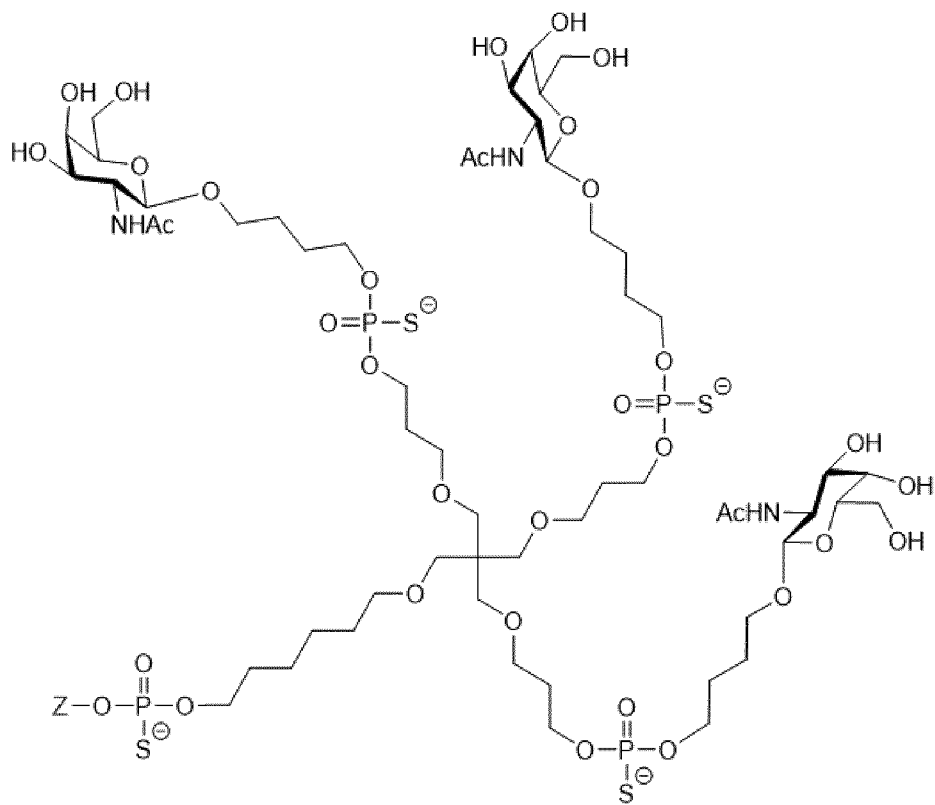
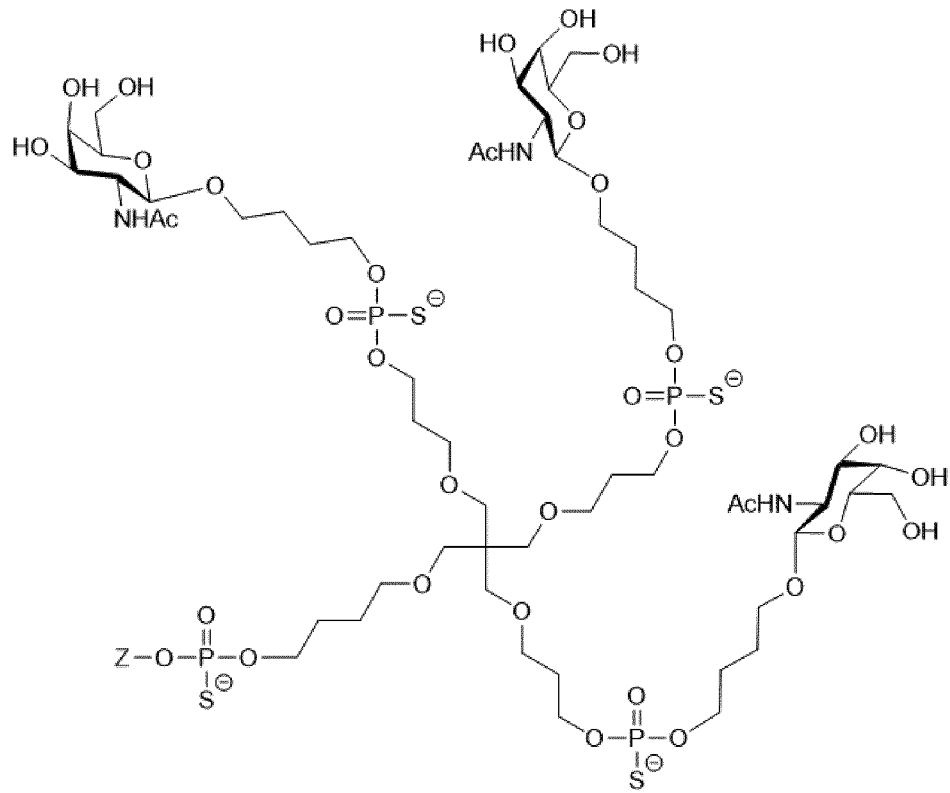
20

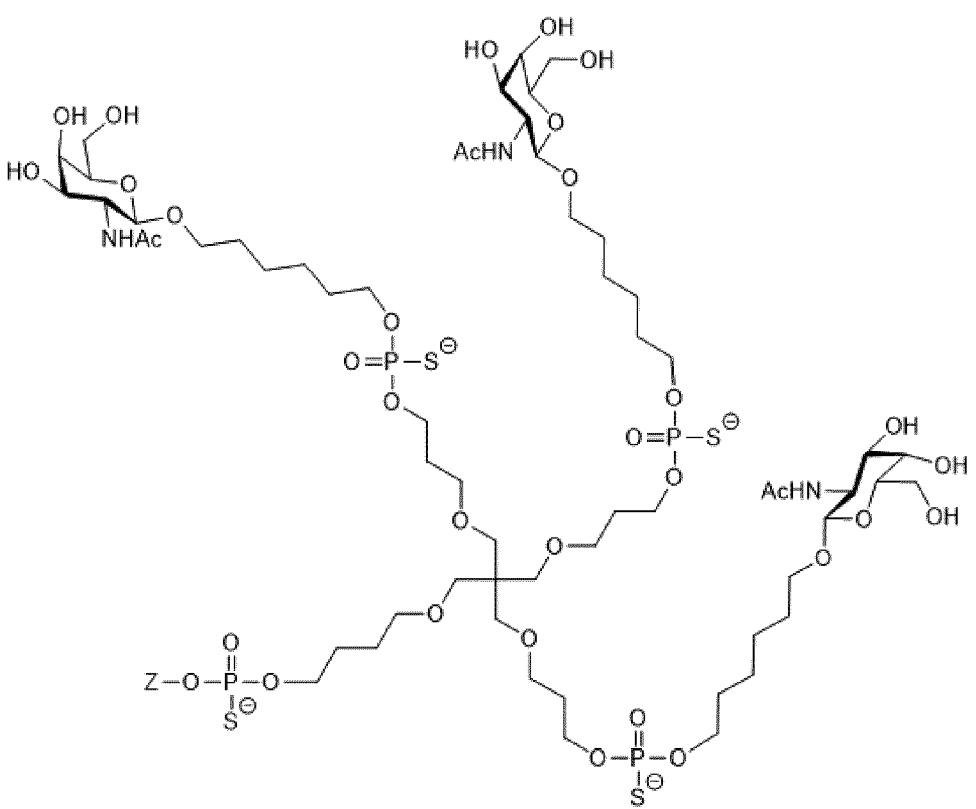
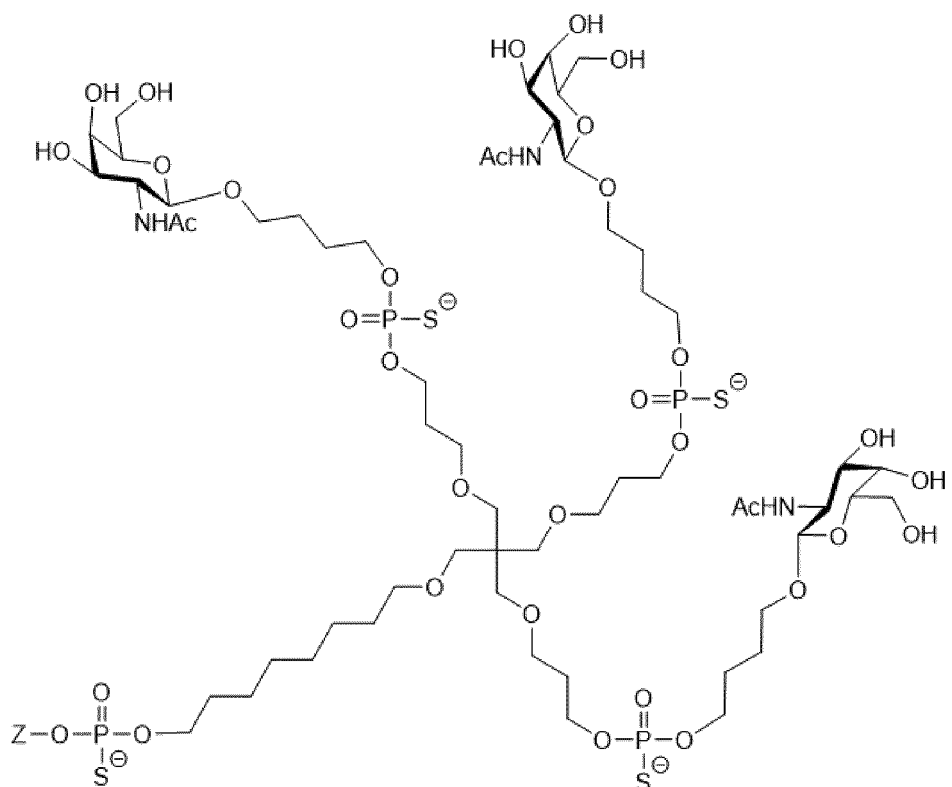
Para compuestos de fórmula (III), X² representa un éter de alquileo de fórmula -C₃H₆-O-CH₂-, es decir, alcoxi C₃-metileno o -CH₂CH₂CH₂OCH₂-.

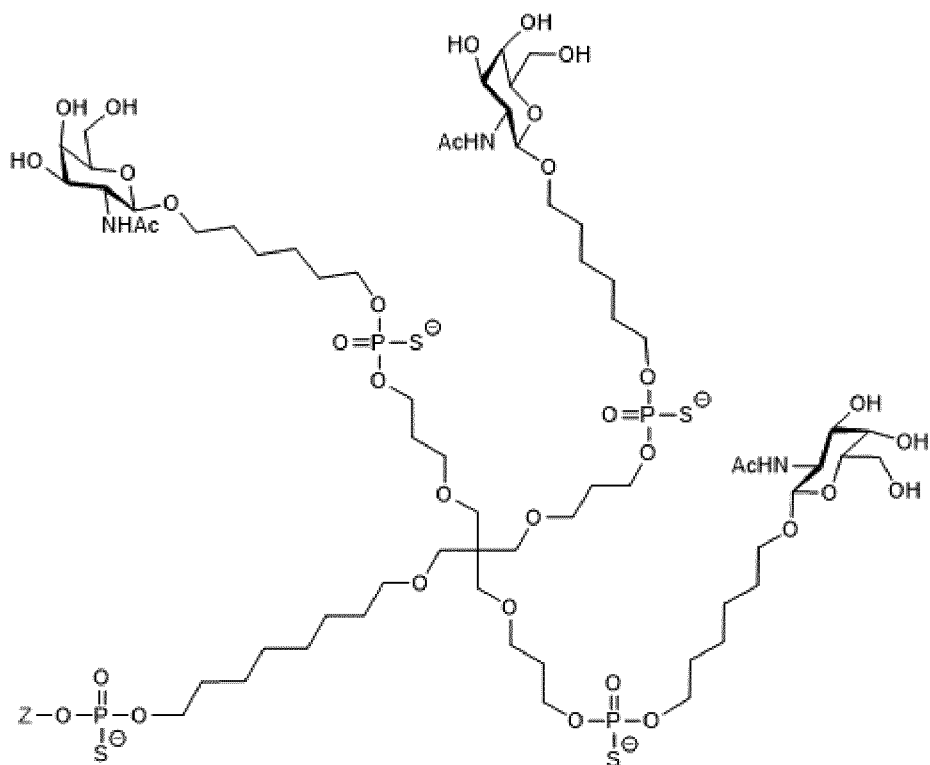
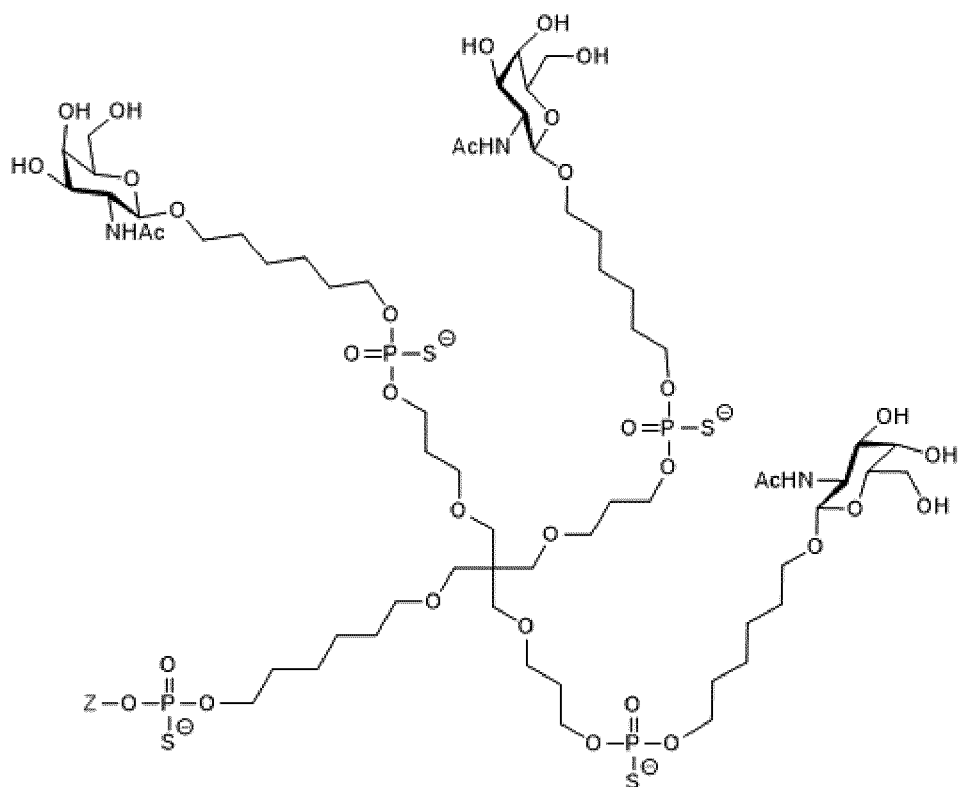
25

La invención proporciona un ácido nucleico conjugado que tiene una de las siguientes estructuras:



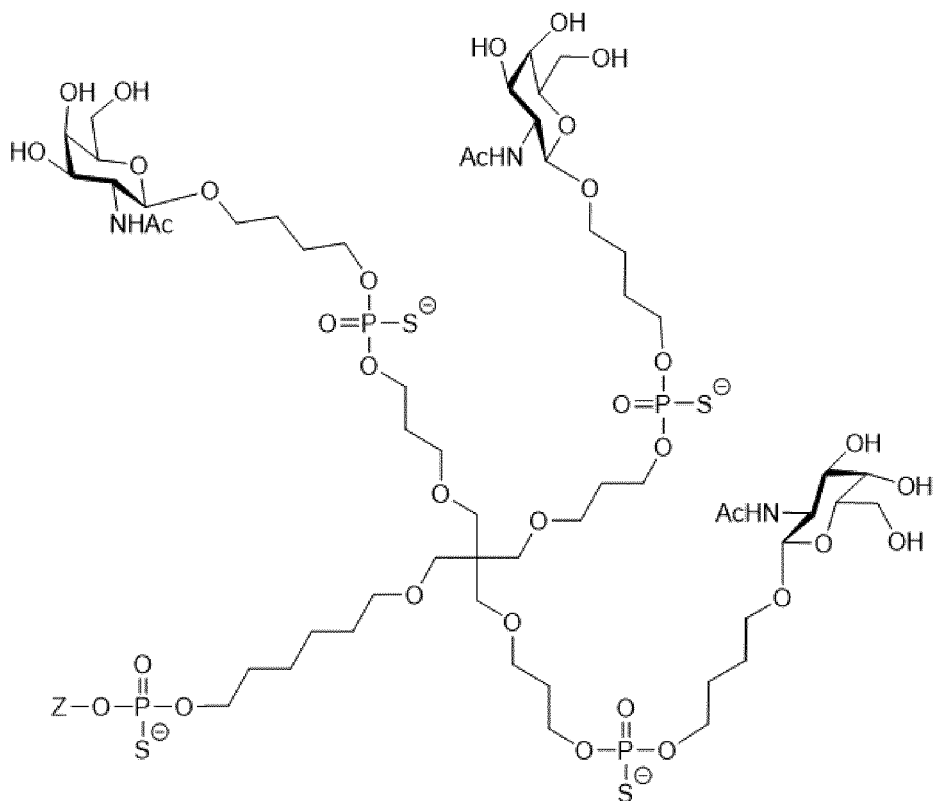






- 5 en donde Z es un ácido nucleico como se ha definido anteriormente en el presente documento y preferentemente está conjugado con el extremo 5' de la segunda cadena del ácido nucleico.

Preferentemente, el ácido nucleico conjugado tiene la siguiente estructura:



5 en donde Z es un ácido nucleico como se define anteriormente en el presente documento y preferentemente está conjugado con el extremo 5' de la segunda cadena.

Un ligando de fórmula (I), (II) o (III) se puede unir en el extremo 3' de la primera cadena (antisentido) y/o en cualquiera de los extremos 3' y/o 5' de la segunda cadena (de sentido). El ácido nucleico puede comprender más de un ligando de fórmula (I), (II) o (III). Sin embargo, se prefiere un único ligando de fórmula (I), (II) o (III) porque un único ligando de este tipo es suficiente para el direccionamiento eficaz del ácido nucleico a las células diana.

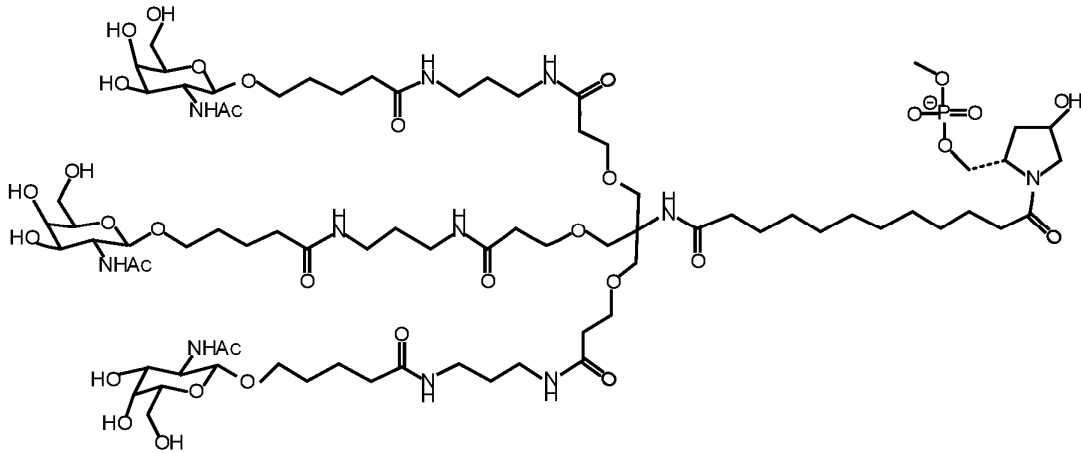
10 Preferentemente en ese caso, al menos los dos últimos, preferentemente al menos los últimos tres y más preferentemente al menos los últimos cuatro nucleótidos en el extremo del ácido nucleico al que está unido el ligando están unidos mediante un enlace fosfodiéster.

15 Preferentemente, el extremo 5' de la primera cadena (antisentido) no está unido a un ligando de fórmula (I), (II) o (III), ya que un ligando en esta posición puede potencialmente interferir con la actividad biológica del ácido nucleico.

20 Un ácido nucleico con un único ligando de fórmula (I), (II) o (III) en el extremo 5' de una cadena es más fácil y, por lo tanto, más barato de sintetizar que el mismo ácido nucleico con el mismo ligando en el extremo 3'. Preferentemente, por lo tanto, un único ligando de cualquiera de las fórmulas (I), (II) o (III) se une de manera covalente a (se conjuga con) el extremo 5' de la segunda cadena del ácido nucleico.

En una realización, el ácido nucleico se conjuga con un ligando que comprende un lípido y, más preferentemente, un ligando que comprende un colesterol.

25 Como alternativa, un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención puede conjugarse con un ligando de la siguiente estructura



Un conjugado de la divulgación puede comprender cualquier ácido nucleico como se divulga en el presente documento conjugado con cualquier ligando o ligandos como se divulga en el presente documento.

5 La presente invención también se refiere a un conjugado para inhibir la expresión de un gen *LPA* en una célula, comprendiendo dicho conjugado una parte de ácido nucleico, que comprende el ácido nucleico de la invención, y al menos una parte de ligando, comprendiendo dicha al menos una parte de ligando un resto enlazador, preferentemente un resto enlazador procedente de serinol, y un ligando de direccionamiento para el direccionamiento *in vivo* de células y estando conjugado exclusivamente con los extremos 3' y/o 5' de una o ambas cadenas de ARN, en donde el extremo 5' de la primera cadena de ARN no está conjugado, en donde:

- 15 (i) la segunda cadena de ARN está conjugada en el extremo 5' con el ligando de direccionamiento, y en donde (a) la segunda cadena de ARN también está conjugada en el extremo 3' con el ligando de direccionamiento y el extremo 3' de la primera cadena de ARN no está conjugado; o (b) la primera cadena de ARN está conjugada en el extremo 3' con el ligando de direccionamiento y el extremo 3' de la segunda cadena de ARN no está conjugado; o (c) tanto la segunda cadena de ARN como la primera cadena de ARN también están conjugadas en los extremos 3' con el ligando de direccionamiento; o
- 20 (ii) tanto la segunda cadena de ARN como la primera cadena de ARN están conjugadas en los extremos 3' con el ligando de direccionamiento y el extremo 5' de la segunda cadena de ARN no está conjugado.

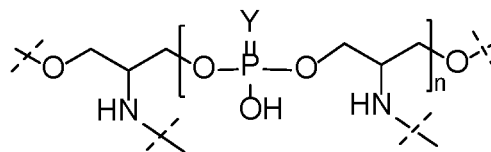
Los ligandos pueden ser monoméricos o multiméricos (por ejemplo, diméricos, triméricos, etc.).

25 De manera adecuada, los ligandos son monoméricos, por lo tanto, contienen un único resto de ligando de direccionamiento, por ejemplo, un único resto GalNAc.

Como alternativa, los ligandos pueden ser ligandos diméricos en donde las partes de ligando comprenden dos restos enlazadores, tales como restos enlazadores procedentes de serinol o restos enlazadores no de serinol, cada uno unido a un único resto de ligando de direccionamiento.

30 Los ligandos pueden ser ligandos triméricos en donde las partes de ligando comprenden tres restos enlazadores, tales como restos enlazadores procedentes de serinol o restos enlazadores no de serinol, cada uno unido a un único resto de ligando de direccionamiento.

35 Los dos o tres restos enlazadores procedentes de serinol pueden estar enlazados en serie, por ejemplo, como se muestra a continuación:



40 en donde n es 1 o 2 e Y es S u O.

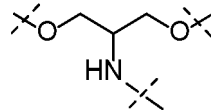
Preferentemente, los ligandos son monoméricos.

45 De manera adecuada, las cadenas de ARN conjugadas están conjugadas con un ligando de direccionamiento a través de un resto enlazador que incluye un enlazador adicional en donde el enlazador adicional es o comprende una cadena

de alquilo C₁₋₁₅ saturada no ramificada o ramificada, en donde opcionalmente uno o más carbonos (por ejemplo 1, 2 o 3 carbonos, adecuadamente 1 o 2, en particular 1) se reemplaza(n) por un heteroátomo seleccionado de O, N, S(O)_p, en donde p es 0, 1 o 2 (por ejemplo, un grupo CH₂ se reemplaza por O, o por NH, o por S, o por SO₂ o un grupo -CH₃ en el extremo de la cadena o en una rama se reemplaza por OH o por NH₂) en donde dicha cadena está opcionalmente sustituida por uno o más grupos oxo (por ejemplo de 1 a 3, tal como 1 grupo).

De manera adecuada, el resto enlazador es un resto enlazador procedente de serinol.

La expresión "resto enlazador procedente de serinol" significa que el resto enlazador comprende la siguiente estructura:



Un átomo de O de dicha estructura normalmente se une a una cadena de ARN y el átomo de N normalmente se une al ligando de direccionamiento.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C₁₋₁₅ saturada no ramificada en donde uno o más carbonos (por ejemplo, 1, 2 o 3 carbonos, adecuadamente 1 o 2, en particular 1) se reemplaza(n) por un átomo de oxígeno.

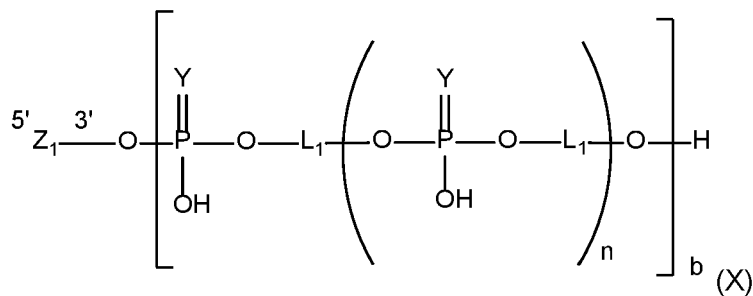
De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de PEG.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C₁₋₁₅ saturada no ramificada.

De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C₁₋₆ saturada no ramificada.

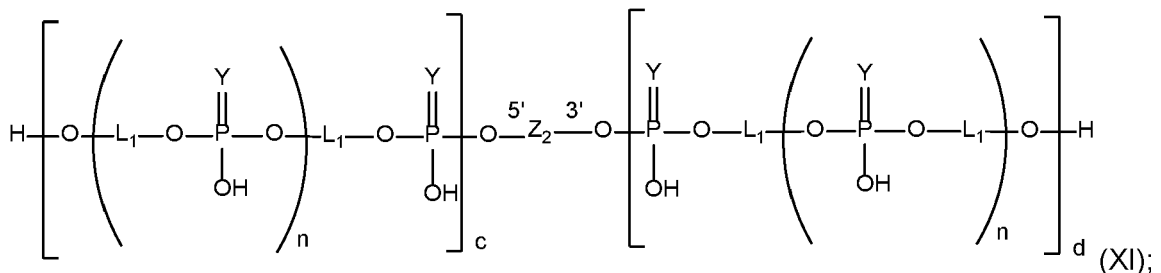
De manera más adecuada, el enlazador adicional comprende una cadena de alquilo C₄ o C₆ saturada no ramificada, por ejemplo, una cadena de alquilo C₄.

En una realización de la invención, la primera cadena de ARN es un compuesto de fórmula (X):



en donde b es 0 o 1; y

la segunda cadena de ARN es un compuesto de fórmula (XI):

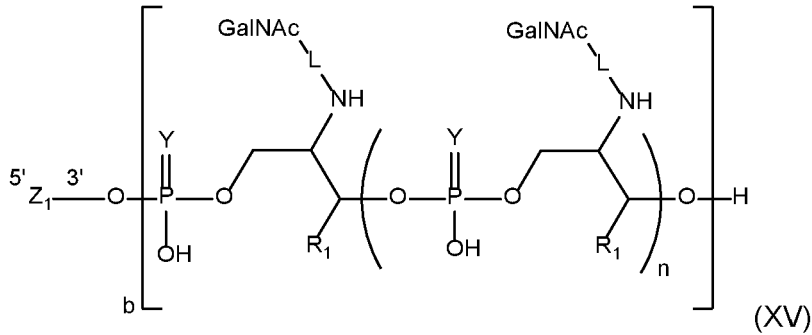


en donde:

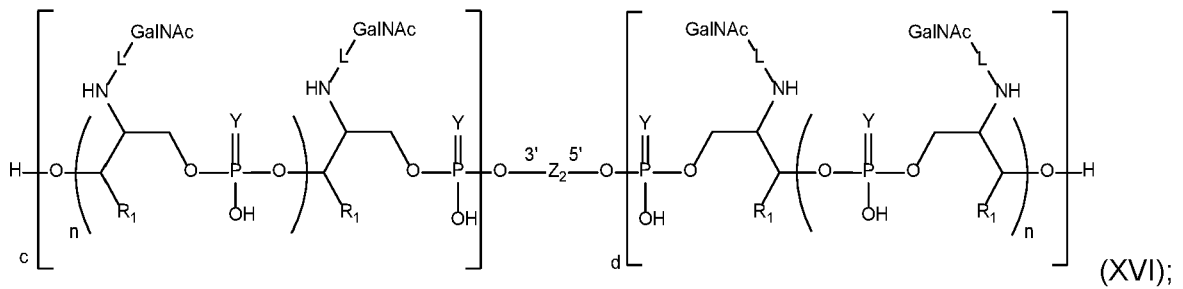
c y d son independientemente 0 o 1;
 Z₁ y Z₂ son las partes de ARN de la primera y segunda cadena de ARN, respectivamente;
 Y es O u S; n es 0, 1, 2 o 3; y
 L₁ es un enlazador al que se une un ligando;

y en donde b + c + d es 2 o 3.

De manera adecuada, la primera cadena de ARN es un compuesto de fórmula (XV)



en donde b es 0 o 1; y
 la segunda cadena de ARN es un compuesto de fórmula (XVI):



en donde c y d son independientemente 0 o 1;
 en donde:

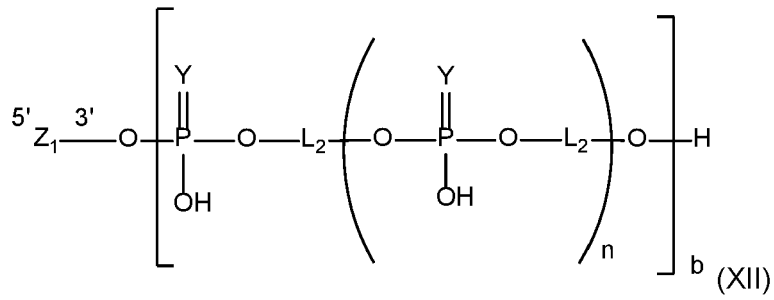
Z₁ y Z₂ son las partes de ARN de la primera y segunda cadena de ARN, respectivamente;
 Y es O u S;
 R₁ es H o metilo;
 n es 0, 1, 2 o 3; y

L es igual o diferente en las fórmulas (XV) y (XVI) y se selecciona del grupo que consiste en:

- (CH₂)_rC(O)-, en donde r = 2 a 12;
- (CH₂-CH₂-O)_s-CH₂-C(O)-, en donde s = 1 a 5;
- (CH₂)_t-CO-NH-(CH₂)_t-NH-C(O)-, en donde t es independientemente 1 a 5;
- (CH₂)_u-CO-NH-(CH₂)_u-C(O)-, en donde u es independientemente 1 a 5; y
- (CH₂)_v-NH-C(O)-, en donde v es 2 a 12; y

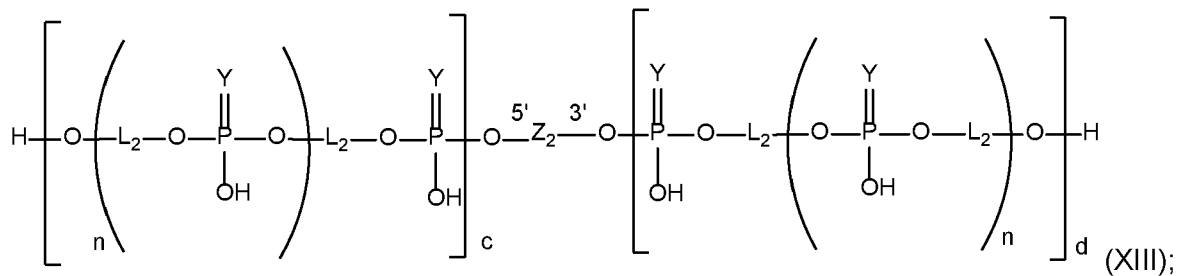
en donde el C(O) terminal (si está presente) está unido al grupo NH; y en donde b + c + d es 2 o 3.

De manera adecuada, la primera cadena de ARN es un compuesto de fórmula (XII):



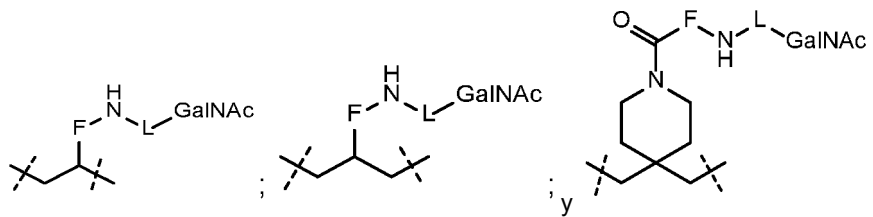
en donde b es 0 o 1; y
la segunda cadena de ARN es un compuesto de fórmula (XIII):

5

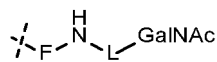


en donde:

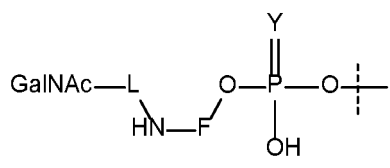
- 10 c y d son independientemente 0 o 1;
Z₁ y Z₂ son las partes de ARN de la primera y segunda cadena de ARN, respectivamente;
Y es O u S;
n es 0, 1, 2 o 3; y
15 L₂ es igual o diferente en las fórmulas (XII) y (XIII) y es igual o diferente en los restos delimitados por b, c y d, y se selecciona del grupo que consiste en:



- 20 o
n es 0 y L₂ es:



- 25 y el grupo OH terminal está ausente de modo que se forma el siguiente resto:



en donde

F es una cadena alquilo C₁₋₈ (por ejemplo, alquilo C₁₋₆) saturada ramificada o no ramificada (tal como no ramificada) en donde uno de los átomos de carbono se reemplaza opcionalmente por un átomo de oxígeno siempre que dicho átomo de oxígeno esté separado de otro heteroátomo (por ejemplo, un átomo de O o N) por al menos 2 átomos de carbono;

5 L es igual o diferente en las fórmulas (XII) y (XIII) y se selecciona del grupo que consiste en:

- (CH₂)_rC(O)-, en donde r = 2 a 12;
- (CH₂-CH₂-O)_s-CH₂-C(O)-, en donde s = 1 a 5;
- (CH₂)_t-CO-NH-(CH₂)_t-NH-C(O)-, en donde t es independientemente 1 a 5;
- 10 - (CH₂)_u-CO-NH-(CH₂)_u-C(O)-, en donde u es independientemente 1 a 5; y
- (CH₂)_v-NH-C(O)-, en donde v es 2 a 12; y

en donde el C(O) terminal (si está presente) está unido al grupo NH; y en donde b + c + d es 2 o 3.

15 En una cualquiera de las fórmulas anteriores donde está presente GalNAc, el GalNAc puede sustituirse por cualquier otro ligando de direccionamiento, tal como los mencionados en el presente documento.

De manera adecuada, b es 0, c es 1 y d es 1; b es 1, c es 0 y d es 1; b es 1, c es 1 y d es 0; o b es 1, c es 1 y d es 1.

20 De manera más adecuada, b es 0, c es 1 y d es 1; b es 1, c es 0 y d es 1; o b es 1, c es 1 y d es 1.

De la manera más adecuada, b es 0, c es 1 y d es 1.

En una realización, Y es O. En otra realización, Y es S.

25 En una realización, R₁ es H o metilo. En una realización, R₁ es H. En otra realización, R₁ es metilo.

En una realización, n es 0, 1, 2 o 3. De manera adecuada, n es 0.

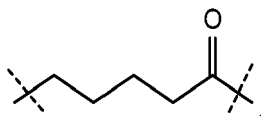
30 En una realización, L se selecciona del grupo que consiste en:

- (CH₂)_rC(O)-, en donde r = 2 a 12;
- (CH₂-CH₂-O)_s-CH₂-C(O)-, en donde s = 1 a 5;
- 35 - (CH₂)_t-CO-NH-(CH₂)_t-NH-C(O)-, en donde t es independientemente 1 a 5;
- (CH₂)_u-CO-NH-(CH₂)_u-C(O)-, en donde u es independientemente 1 a 5; y
- 40 - (CH₂)_v-NH-C(O)-, en donde v es 2 a 12;

en donde el C(O) terminal está unido al grupo NH.

45 De manera adecuada, L es -(CH₂)_r-C(O)-, en donde r = 2 a 12. De manera adecuada, r = 2 a 6. De manera más adecuada, r = 4 o 6, por ejemplo, 4.

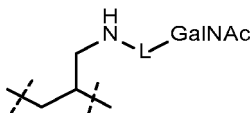
De manera adecuada, L es:



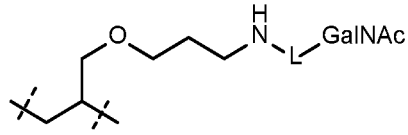
50 Los restos F ilustrativos incluyen (CH₂)₁₋₆, por ejemplo, (CH₂)₁₋₄, por ejemplo, CH₂, (CH₂)₄, (CH₂)₅ o (CH₂)₆, o CH₂O(CH₂)₂₋₃, por ejemplo, CH₂O(CH₂)CH₃.

De manera adecuada, L₂ es:

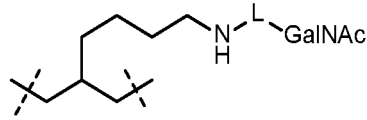
55



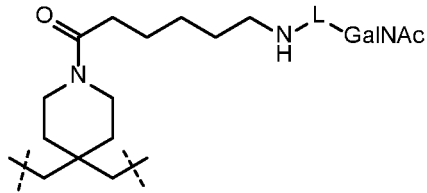
De manera adecuada, L₂ es:



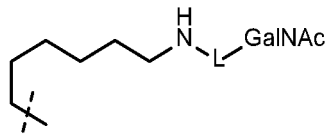
5 De manera adecuada, L₂ es:



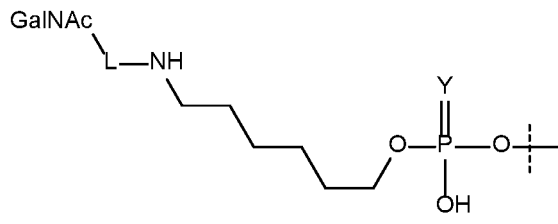
De manera adecuada, L₂ es:



10 De manera adecuada, n es 0 y L₂ es:



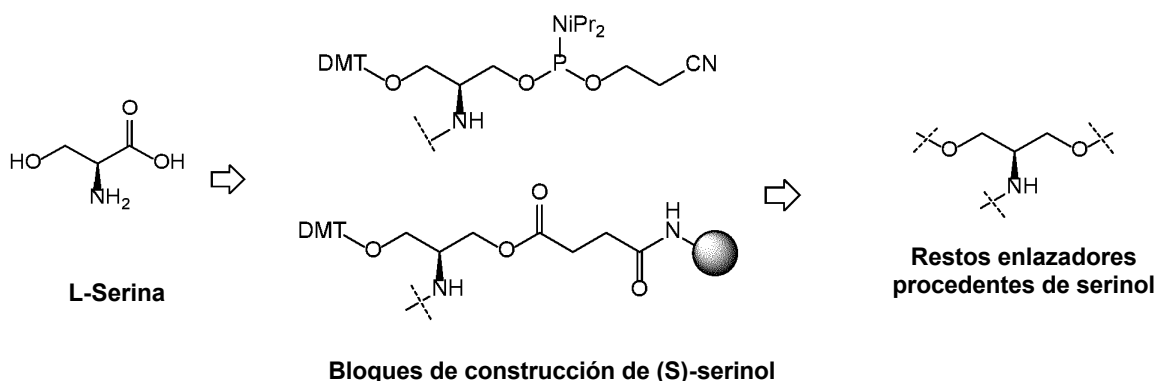
15 y el grupo OH terminal está ausente de modo que se forma el siguiente resto:



20 en donde Y es como se define en otra parte en el presente documento.

Dentro del resto delimitado por b, c y d, L₂ es normalmente el mismo. Entre los restos delimitados por b, c y d, L₂ puede ser el mismo o diferente. En una realización, L₂ en el resto delimitado por c es el mismo que el L₂ en el resto delimitado por d. En una realización, L₂ en el resto delimitado por c no es lo mismo que L₂ en el resto delimitado por d. En una realización, el L₂ en los restos delimitados por b, c y d es el mismo, por ejemplo, cuando el resto enlazador es un resto enlazador procedente de serinol.

Los restos enlazadores procedentes de serinol pueden estar basados en serinol en cualquier estereoquímica, es decir, procedentes del isómero L-serina, isómero D-serina, una serina racémica u otra combinación de isómeros. En un aspecto preferido de la invención, el resto serinol-GalNAc (SerGN) tiene la siguiente estereoquímica:



es decir, se basa en un bloque de construcción con soporte sólido de (S)-serinol-amidita o (S)-serinol succinato procedente del isómero L-serina.

5 En una realización, las células diana son hepatocitos.

Particularmente preferido es un ácido nucleico en donde la primera cadena comprende, o consiste preferentemente en, la SEQ ID NO: 165 y la segunda cadena comprende opcionalmente, o consiste preferentemente en, la SEQ ID NO: 163. Este ácido nucleico se puede conjugar de manera adicional con un ligando. Aún más preferido es un ácido nucleico en donde la primera cadena comprende, o consiste preferentemente en, la SEQ ID NO: 165 y la segunda cadena opcionalmente comprende, o consiste preferentemente en, la SEQ ID NO: 164. El más preferido es un ARNip que consiste en la SEQ ID NO: 165 y la SEQ ID NO: 164. En una realización, el ácido nucleico es el conjugado 21.

Composiciones, usos y métodos

15 La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden el ácido nucleico o el ácido nucleico conjugado de la invención. Las composiciones farmacéuticas pueden usarse como medicamentos o como agentes de diagnóstico, solos o en combinación con otros agentes. Por ejemplo, uno o más conjugados de ácido nucleico de la invención pueden combinarse con un vehículo de administración (por ejemplo, liposomas) y/o excipientes, tales como portadores y diluyentes. También pueden añadirse otros agentes tales como conservantes y estabilizantes. Se conocen en la materia y dentro del conocimiento del experto en la materia métodos para la administración de moléculas de ácido nucleico.

25 La invención también incluye una composición farmacéutica que comprende uno o más ácidos nucleicos o ácidos nucleicos conjugados de acuerdo con la presente invención en un excipiente fisiológica/farmacéuticamente aceptable, tal como un estabilizante, conservante, diluyente, tampón y similares.

30 La composición farmacéutica puede ser una suspensión o solución acuosa inyectable estéril, o estar en forma liofilizada o adherida, absorbida o incluida en cualquier otra sustancia portadora galénica adecuada, tal como gránulos, comprimidos, cápsulas, nanopartículas, geles, comprimidos, perlas o estructuras similares.

Un aspecto de la invención proporciona un ácido nucleico bicatenario de acuerdo con la invención que es capaz de inhibir la expresión de *LPA*, preferentemente en una célula, para su uso como medicamento.

35 Otro aspecto de la invención se refiere a un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención o a la composición farmacéutica que comprende el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad, trastorno o síndrome, preferentemente una enfermedad, trastorno o síndrome asociado con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). El tratamiento puede ser para prevenir y/o reducir el riesgo de padecer y/o para tratar un ictus, aterosclerosis, trombosis o enfermedades cardiovasculares tales como cardiopatía coronaria o estenosis de la válvula aórtica y cualquier otra enfermedad o patología asociada a niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). El tratamiento puede ser para prevenir y/o reducir el riesgo de padecer y/o para tratar una enfermedad cardiovascular aterosclerótica, una enfermedad cerebrovascular aterosclerótica, hiperlipidemia y dislipidemia, preferentemente en donde la enfermedad está asociada con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). El tratamiento puede ser para prevenir y/o reducir el riesgo de padecer y/o para tratar la estenosis de la válvula aórtica calcificada, accidente cerebrovascular isquémico, arteriopatía coronaria, arteriopatía periférica, aneurisma aórtico abdominal, insuficiencia cardíaca secundaria a miocardiopatía isquémica o hipercolesterolemia familiar, preferentemente en donde la enfermedad está asociada con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). Preferentemente, el tratamiento es para prevenir y/o reducir el riesgo de padecer y/o para tratar la estenosis de la válvula aórtica, tal como estenosis de la válvula aórtica calcificada o hipercolesterolemia familiar, preferentemente en cada caso cuando la enfermedad o trastorno está asociado con niveles elevados de partículas que contienen Lp(a). En general, un nivel deseable de partículas que contienen Lp(a) en el suero se describe

como un nivel de menos de 14 mg/dl. Un nivel elevado de partículas que contienen Lp(a) es un nivel de al menos 14, preferentemente al menos 20, más preferentemente al menos 30, más preferentemente al menos 40 y lo más preferentemente al menos 50 mg/dl de partículas que contienen Lp(a) en el suero de un sujeto.

- 5 La invención incluye una composición farmacéutica que comprende uno o más ácidos nucleicos o ácidos nucleicos conjugados de acuerdo con la presente invención en un excipiente fisiológica/farmacéuticamente aceptable, tal como un estabilizador, conservante, diluyente, tampón y similares.

10 Las expresiones "partículas que contienen Lp(a)" y "partículas de Lp(a)" se utilizan indistintamente a lo largo de esta divulgación.

15 Las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención pueden administrarse a un sujeto mamífero en una dosis farmacéuticamente eficaz. El mamífero puede seleccionarse de un ser humano, un primate no humano, un simio o prosimio, un perro, un gato, un caballo, ganado bovino, un cerdo, una cabra, una oveja, un ratón, una rata, un hámster, un erizo y un conejillo de Indias, u otras especies de relevancia. Por este motivo, la expresión "LPA" o "LPA" como se utiliza en el presente documento, indica ácido nucleico o proteína en cualquiera de las especies mencionadas anteriormente, si se expresa de forma natural o artificial, pero preferentemente esta expresión indica ácidos nucleicos o proteínas humanas.

20 El ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la presente invención también se puede administrar en combinación con otros compuestos terapéuticos, ya sea administrado por separado o simultáneamente, por ejemplo, en forma de una dosis unitaria combinada. El agente terapéutico adicional se puede seleccionar del grupo que comprende un oligonucleótido, una molécula pequeña, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal y un péptido. Una conjugación molecular con otras entidades moleculares biológicamente activas, tales como péptidos, ligandos celulares o artificiales o moléculas pequeñas y grandes también es posible.

30 Los expertos en la materia pueden determinar niveles de dosificación para el medicamento y las composiciones farmacéuticas de la invención mediante experimentación rutinaria. En una realización, una dosis unitaria puede contener entre aproximadamente 0,01 mg/kg y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de ácido nucleico o ácido nucleico conjugado. Como alternativa, la dosis puede ser de 10 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal, o de 1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal, o de 0,05 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal, o de 0,1 mg/kg a 5 mg/kg de peso corporal, o de 0,1 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal, o de 0,1 mg/kg a 0,5 mg/kg de peso corporal, o de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg de peso corporal. Como alternativa, la dosis puede ser de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,6 mg/kg a aproximadamente 8 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,7 mg/kg a aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,8 mg/kg a aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 0,9 mg/kg a aproximadamente 3,5 mg/kg de peso corporal, o de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal o aproximadamente 3 mg/kg de peso corporal, en donde "aproximadamente" es una desviación de hasta un 30 %, preferentemente hasta un 20 %, más preferentemente hasta un 10 %, aún más preferentemente hasta un 5 % y lo más preferentemente el 0 % del valor indicado. Los niveles de dosificación también se pueden calcular a través de otros parámetros tales como, por ejemplo, el área de la superficial corporal.

45 El ácido nucleico descrito en el presente documento puede inhibir la expresión de LPA. El ácido nucleico descrito en el presente documento puede inhibir parcialmente la expresión de LPA. La inhibición puede ser completa, es decir, 0 % en comparación con el nivel de expresión de LPA en ausencia del ácido nucleico de la invención. La inhibición de la expresión de LPA puede ser parcial, es decir, puede ser del 15 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 %, el 90 %, el 95 % o valores intermedios de la expresión de LPA en ausencia de un ácido nucleico de la invención. La inhibición puede durar 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, 8 semanas, 10 semanas, 11 semanas, 12 semanas, 13 semanas, 14 semanas o hasta 3 meses, cuando se utiliza en un sujeto, tal como un paciente humano. Un ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la invención, o composiciones que incluyen el mismo, puede(n) ser para uso en un régimen que comprende tratamientos una o dos veces por semana, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas, cada cinco semanas, cada seis semanas, cada siete semanas o cada ocho semanas, o en regímenes con frecuencia de dosificación variable, tal como combinaciones de los intervalos antes mencionados. El ácido nucleico puede ser para uso por vía subcutánea, intravenosa o utilizando cualquier otra vía de aplicación tal como oral, rectal o intraperitoneal, preferentemente para uso por vía subcutánea.

60 En células y/o sujetos tratados con, o que reciben, el ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la presente invención, la expresión de LPA se puede inhibir en comparación con las células y/o sujetos no tratados en un intervalo del 15 % al 100 %, pero al menos aproximadamente un 30 %, un 35 %, un 40 %, un 45 %, un 50 %, un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o el 100 % o valores intermedios. El nivel de inhibición puede permitir el tratamiento de una enfermedad asociada con la expresión o sobreexpresión de LPA, o puede servir para investigar más a fondo las funciones y papeles fisiológicos del producto génico LPA.

65 El ácido nucleico o ácido nucleico conjugado de la presente invención se puede producir con métodos habituales en la materia, que incluyen síntesis química o expresión del ácido nucleico *in vitro* (por ejemplo, transcripción *run-off*) o

in vivo. Por ejemplo, con síntesis química en fase sólida o con un vector de expresión basado en ácido nucleico que incluye derivados víricos o sistemas de expresión parcial o completamente sintéticos. En una realización, el vector de expresión se puede utilizar para producir el ácido nucleico de la invención *in vitro*, dentro de un organismo hospedador intermedio o tipo de célula, dentro de un organismo intermedio o final o dentro de la célula diana deseada. Los métodos para la producción (síntesis o transcripción enzimática) del ácido nucleico descrito en el presente documento se conocen por los expertos en la materia.

Figuras

- 10 En la figura 1 se muestran los resultados de un cribado de moléculas de ARNip no conjugadas para la inhibición de la expresión del ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.
En las figuras 2A y 2B se muestra la respuesta a la dosis de moléculas de ARNip dirigidas a *LPA* no conjugadas en la expresión del ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.
- 15 En la figura 3 se muestra la inhibición de la expresión del ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios humanos y de macaco mediante diferentes dosis de moléculas de ARNip conjugadas con GalNAc-L1 *LPA*-1038 administradas mediante captación mediada por receptor.
En la figura 4 se muestran ejemplos representativos de la atenuación del ARNm de *LPA* mediante ARNip de GalNAc conjugados con L6 indicados en hepatocitos primarios humanos administrados mediante captación mediada por receptor.
- 20 En la figura 5 se muestra la síntesis de A0268, que es un oligonucleótido monocatenario conjugado con mono-GalNAc en 3' y es el material de partida en la síntesis del conjugado 1 y el conjugado 3. (ps) indica enlace de fosforotioato.
En la figura 6 se muestra la síntesis de A0006, que es un oligonucleótido monocatenario conjugado con GalNAc de tres antenas en 5' que se utiliza para la síntesis del conjugado de referencia 4. (ps) indica enlace de fosforotioato.
- 25 En la figura 7 se ilustra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR. En particular, en la figura 7A se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados de referencia (CR) 1 y 3, así como el control sin tratamiento "ST"; En la figura 7B se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados de referencia (CR) 2 y 3, así como el control sin tratamiento "ST"; y en la figura 7C se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados 1, 2 y 3, así como mediante CR3 y el control sin tratamiento "ST". Los conjugados de referencia 1 y 2 representan conjugados de comparación. El conjugado de referencia 3 representa un ARNip de GalNAc no dirigido y "sin tratamiento" ("ST") representa células no tratadas. Tanto el CR3 como ST son controles negativos. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a *Ptenll*.
- 30 En la figura 8 se muestra la evolución temporal de TTR en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 4 a los 7, 14 y 27 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugados 1 a 3, conjugados de referencia (CR) 1, 2 y 4 e individuos tratados de forma simulada (PBS).
- 35 En la figura 9 se muestra la síntesis de oligonucleótidos de precursores de oligonucleótidos conjugados con GalNAc en 3' y 5' (tal como el compuesto X0385B-prec).
En la figura 10 se muestra la misma respuesta a la dosis de atenuación para el ARNip dirigido a *LPA* con dos unidades individuales de GalNAc conjugadas con la segunda cadena en comparación con una unidad triantenaria de GalNAc en la segunda cadena en 5' en hepatocitos primarios de macaco.
- 40 En la figura 11 se ilustra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR. En particular, en la figura 11A se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados 4, 5, 6 y 2 en comparación con "Luc" (Conjugado de referencia 3) así como el control sin tratamiento "ST"; en la figura 11B se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados 7 y 2, en comparación con "Luc" (Conjugado de referencia 3) así como con el control sin tratamiento "ST". Luc o conjugado de referencia 3 (CR3) representa un ARNip de GalNAc no dirigido y "sin tratamiento" ("ST") representa células no tratadas. Tanto el CR3 como ST son controles negativos. El nivel de ARNm se normalizó frente a *Ptenll*.
- 45 En la figura 12 se ilustra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR. En particular, en la figura 12A se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados 8, 9, 10, 11 y 2 en comparación con "Luc" (Conjugado de referencia 3) así como el control sin tratamiento "ST"; en la figura 12B se muestra la determinación *in vitro* de la atenuación de TTR mediante los conjugados 12 y 2, en comparación con "Luc" (Conjugado de referencia 3) así como con el control sin tratamiento "ST". Luc o conjugado de referencia 3 representa un ARNip de GalNAc no dirigido y "sin tratamiento" ("ST") representa células no tratadas. Tanto el CR3 como ST son controles negativos. El nivel de ARNm se normalizó frente a *Ptenll*.
- 50 En la figura 13 se ilustra la determinación *in vitro* de la atenuación del ARNm de *LPA* mediante el conjugado 19 en comparación con los controles. Ctr representa un ARNip de GalNAc no dirigido y "sin tratamiento" ("ST") representa células no tratadas. Tanto Ctr como ST son controles negativos. Los niveles de ARNm se normalizaron frente a *ACTB*.
- 55 En la figura 14 se muestra una evolución temporal de los niveles del ARNm de *Aldh2* hepático en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugado 15, conjugado de referencia (CR) 6 e individuos tratados de forma simulada (PBS). Los niveles de ARNm se normalizaron frente a *Pten*.
- 60 En la figura 15 se muestra una evolución temporal de los niveles del ARNm de *Aldh2* hepático en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugado 16, conjugado de referencia (CR) 7 e individuos tratados de forma simulada (PBS). Los niveles de ARNm se normalizaron frente a *Pten*.
- 65

En la figura 16 se muestra una evolución temporal de los niveles del ARNm de *Tmprss6* hepático en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg - Conjugado 18, conjugado de referencia (CR) 8 e individuos tratados de forma simulada (PBS). Los niveles de ARNm se normalizaron frente a *Pten*.

5 En la figura 17 se muestra la estabilidad en suero de los conjugados 4, 5, 6, 7 y 2, y del control sin tratamiento (ST) a 37 °C durante 3 días.

En la figura 18 se muestra la estabilidad en suero de los conjugados 8, 9, 10, 11, 12 y 2, y del control sin tratamiento (ST) a 37 °C durante 3 días.

10 En la figura 19 se muestra la reducción en el ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios humanos mediante el conjugado 21.

En la figura 20 se muestra la reducción en el ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios de macaco mediante el conjugado 21.

En la figura 21 se muestra que el conjugado 21 no afecta el nivel de la expresión génica de *APOB*.

15 En la figura 22 se muestra que el conjugado 21 no afecta el nivel de la expresión génica de *PLG*.

En la figura 23 se muestra una evolución temporal de la inhibición de la Lp(a) en suero durante 29 días en macacos con diferentes dosis del conjugado 21.

En la figura 24 se muestra una curva de respuesta a la dosis del conjugado 21 que muestra la reducción de Lp(a) en suero el día 29 en macaco.

20 Ejemplos

La numeración a la que se hace referencia en cada ejemplo es específica para dicho ejemplo.

Ejemplo comparativo 1

25

Aquí se muestran varias moléculas de ARNip conjugadas y modificadas utilizadas para ejemplos funcionales.

Derivados de LPA-1038:

30 GalNAc-LPA-1038-L1

Primera cadena (SEQ ID NO: 119, basada en la SEQ ID NO: 5)

35 OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA 3'

Segunda cadena (SEQ ID NO: 120, basada en la SEQ ID NO: 6)

40 5'[ST23 (ps)]3 trebler largo (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

GalNAc-LPA-1038-L6

45 Primera cadena (SEQ ID NO: 121, basada en la SEQ ID NO: 5)

OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA 3'

50 Segunda cadena (SEQ ID NO: 122, basada en la SEQ ID NO: 6)

5'[ST23 (ps)]3 ST43 (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

55 FN (N=A, C, G, U) indica 2'Fluoro, 2' desoxinucleósidos

OMeN (N=A, C, G, U) indica nucleósidos 2'O metilo

(ps) indica un enlace fosforotioato

60 **Otro ejemplo son los derivados de LPA-1041:**

GalNAc-LPA-1041-L1

65 Primera cadena (SEQ ID NO: 123, basada en la SEQ ID NO: 9)

5' OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-

FC-(ps)-OMeG 3'

Segunda cadena (SEQ ID NO: 124, basada en la SEQ ID NO: 10)

5 5'[ST23 (ps)]3 trebler largo (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

GalNAc-LPA-1041-L6

10 Primera cadena (SEQ ID NO: 125, basada en la SEQ ID NO: 9)

5' OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG 3'

15 Segunda cadena (SEQ ID NO: 126, basada en la SEQ ID NO: 10)

5'[ST23 (ps)]3 ST43 (ps) FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU 3'

20 FN (N=A, C, G, U) indica 2'Fluoro, 2' desoxinucleósidos

OMeN (N=A, C, G, U) indica nucleósidos 2'O metilo

(ps) indica un enlace fosforotioato

25 Todos los oligonucleótidos se obtuvieron de fabricantes comerciales de oligonucleótidos (Biospring, Frankfurt, Alemania, o RiboBio, Guangzhou, Guangdong, República Popular China) o sintetizado en un sintetizador oligopiloto AKTA (interno) usando química de fosforamidita convencional. Se usaron soporte sólido disponible en el mercado y fosforamiditas de 2'O-Metilo ARN, fosforamiditas de 2'fluoro ADN (todas con protección convencional) y fosforamiditas de trebler largo comercialmente disponibles (Glen research). La síntesis se realizó utilizando soluciones 0,1 M de la fosforamidita en acetonitrilo seco y se utilizó benciltiotetrazol (BTT) como activador (0,3 M en acetonitrilo). Todos los demás reactivos eran reactivos convencionales disponibles comercialmente.

35 La conjugación del respectivo sintón de GalNac (por ejemplo, ST23, ST41, ST43) se consiguió mediante el acoplamiento de la fosforamidita respectiva al extremo 5' de la oligocadena en condiciones convencionales de acoplamiento de fosforamidita. Se introdujeron fosforotioatos usando reactivos de tiolación convencionales disponibles en el mercado (EDITH, tecnologías Link).

40 Las cadenas individuales se separaron de la CPG usando metilamina (acuosa al 40 %) y el oligonucleótido bruto resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (Resource Q, 6 ml, GE Healthcare) en un sistema de HPLC AKTA Pure utilizando un gradiente de cloruro de sodio. Las fracciones que contenían producto se agruparon, se desalaron en una columna de exclusión por tamaño (Zetadex, EMP Biotech) y se liofilizaron.

45 Para la hibridación, se disolvieron en agua cantidades equimolares de las cadenas individuales respectivas y se calentaron a 80 °C durante 5 min. Después de enfriar gradualmente a TA, se liofilizó el dúplex resultante.

Las secuencias de los ácidos nucleicos resultantes (ARNip) se exponen en la tabla 1 a continuación.

50 Tabla 1: Secuencias de ácido nucleico no conjugadas analizadas para la inhibición de la expresión de ARNm de LPA. Se indican las secuencias y el patrón de modificación aplicado

Tabla 1

SEQ ID NO:	ID del ARNip	cadena	Secuencia	Modificaciones
1	LPA-1014	primera cadena	5'ucguauaacaauaaggggc 3'	5381616272616284847
2		segunda cadena	5'gccccuuauuguuauacga 3'	4737351615451616382
3	LPA-1024	primera cadena	5'gauaacucuguccauuacc 3'	8252635354537251637
4		segunda cadena	5'gguaauggacagaguauac 3'	4816254827282815253
5	LPA-1038	primera cadena	5'auaacucuguccauuacca 3'	6162717181736152736
6		segunda cadena	5'ugguaauggacagaguauu 3'	1845261846364645161

ES 2 932 295 T3

(continuación)

SEQ ID NO:	ID del ARNip	cadena	Secuencia	Modificaciones
7	LPA-1040	primera cadena	5'uaacucuguccauuaccgu 3'	5263535453725163745
8		segunda cadena	5'acgguaauggacagaguua 3'	2748162548272828152
9	LPA-1041	primera cadena	5'auaacucuguccauuaccg 3'	6162717181736152738
10		segunda cadena	5'cgguaauggacagaguua 3'	3845261846364645161
11	LPA-1055	primera cadena	5'agaauguccucgauaacu 3'	6462545473538252635
12		segunda cadena	5'aguuaucgaggcacauucu 3'	2815253828472725171
13	LPA-1057	primera cadena	5'auaacucuguccaucacca 3'	6162717181736172736
14		segunda cadena	5'uggugauggacagaguua 3'	1845461846364645161
15	LPA-1058	primera cadena	5'auaacucuguccaucaccu 3'	6162717181736172735
16		segunda cadena	5'aggugauggacagaguua 3'	2845461846364645161
17	LPA-1061	primera cadena	5'uaacucuguccauuaccu 3'	5263535453725163725
18		segunda cadena	5'augguaauggacagaguua 3'	2548162548272828152
19	LPA-1086	primera cadena	5'auguccuugauaacucug 3'	6181837154616271718
20		segunda cadena	5'cagaguuaucaggcacau 3'	3646451617264836361
21	LPA-1099	primera cadena	5'aguuggucgucucagaa 3'	6451845471835172826
22		segunda cadena	5'uucugaagcagcaccacu 3'	1535462836472736271
23	LPA-1102	primera cadena	5'aaauaggggucgaccagg 3'	6252648483547363648
24		segunda cadena	5'ccuguggcagccuuuuu 3'	3718184728373715251
25	LPA-1116	primera cadena	5'uaacucuguccaucaccu 3'	5263535453725363725
26		segunda cadena	5'auggugauggacagaguua 3'	2548182548272828152
27	LPA-1127	primera cadena	5'augagccucgauaacucug 3'	6182837174616271718
28		segunda cadena	5'cagaguuaucgaggcucu 3'	3646451617464835361
29	LPA-1128	primera cadena	5'aaugagccucgauaacucu 3'	6254647353825263535
30		segunda cadena	5'agaguuaucgaggcucu 3'	2828152538284717251
31	LPA-1141	primera cadena	5'aaugcuuccaggacauuuc 3'	6254715372846361517
32		segunda cadena	5'gaaauguccuggaagcau 3'	4626181735482647251
33	LPA-1151	primera cadena	5'acagugguggagaauuguc 3'	6364548184646254547
34		segunda cadena	5'gcacauuccaccacugu 3'	4727251717363727181
35	LPA-1171	primera cadena	5'guauguccucgauaacuc 3'	8161818371746162717
36		segunda cadena	5'gaguuaucgaggcacauac 3'	4645161746483636163
37	LPA-1177	primera cadena	5'ucgauaacucuguccauca 3'	5382526353545372536
38		segunda cadena	5'ugauggacagaguuaucga 3'	1825482728281525382
39	LPA-1189	primera cadena	5'ugucacuggacauuguguc 3'	5453635482725181817
40		segunda cadena	5'gacacaauuccagugaca 3'	4636362545372818272
41	LPA-1244	primera cadena	5'cugggaucagguguaac 3'	7184825372548181627
42		segunda cadena	5'guuacaccauggauccag 3'	4516363725482537364

(continuación)

SEQ ID NO:	ID del ARNip	cadena	Secuencia	Modificaciones
43	LPA-1248	primera cadena	5'agaugaccaagcuuggcag 3'	6461827362835184728
44		segunda cadena	5'cugccaagcuuggucaucu 3'	3547362835184536171

Tabla 1: Las modificaciones de los nucleótidos se representan con los siguientes números (columna 4), 1=2'F-dU, 2=2'F-dA, 3=2'F-dC, 4=2'F-dG, 5=2'-OMe-rU; 6=2'-OMe-rA; 7=2'-OMe-rC; 8=2'-OMe-rG.

- 5 Tabla 2: A continuación se muestran las secuencias de conjuntos de amplicones de qPCR de *LPA*, *ApoB*, β -*actina* y *PTEN* que se utilizaron para medir los niveles de ARNm.

Tabla 2

Gen	Especie	Secuencias	SEQ ID NO:
LPA: (superior)	ser humano	5' AAGTGCCTTGCAGCTCC 3'	45
LPA: (inferior)		5' CCTGGACTGTGGGCTTT 3'	46
LPA: (sonda)		5' CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGAGC 3'	47
LPA (superior)	macaco	5' GTGTCCTCGCAACGTCCA 3'	48
LPA (inferior)		5' GACCCCGGGCTTTG 3'	49
LPA (sonda)		5'TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG 3'	50
APOB (superior)	ser humano	5' TCATTCTTCCCAAAGAGACC 3'	51
APOB (inferior)		5' CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG 3'	52
APOB (sonda)		5' CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA 3'	53
β -actina (superior)	ser humano	5' GCATGGGTCAGAAGGATTCCTAT 3'	54
β -actina (inferior)		5' TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT 3'	55
β -actina (sonda)		5' TCGAGCACGGCATCGTCACCAA 3'	56
β -actina (superior)	macaco	5' AAGCCAACCGCGAGAAG 3'	57
β -actina (inferior)		5' AGAGGCGTACAGGGACAGCA 3'	58
β -actina (sonda)		5' TGAGACCTTCAACCCCCAGCCATGTAC 3'	59
PPIB (superior)	ser humano	5' AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT 3'	60
PPIB (inferior)		5' GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT 3'	61
PPIB (sonda)		5' TGTTCACAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC 3'	62

10 Ejemplo comparativo 2

Cribado de moléculas de ARNip no conjugadas (Tabla 1) para la inhibición de la expresión del ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.

- 15 Los complejos de transfección liposomal se prepararon por triplicado en una proporción de 1,5 μ l de RNAiMax (ThermoFisher)/80 pmol de las moléculas de ARNip indicadas. El complejo se diluyó a las concentraciones indicadas de 2,5 nM y 25 nM, respectivamente (valores representados por pares como barras grises claras y más oscuras). Las células de papiloma de células de transición de vejiga humana RT4 que expresan de manera endógena *LPA* se sembraron a una densidad de 125.000 células por pocillo en formato de 24 pocillos sobre complejos de transfección
- 20 previamente sembrados (transfección inversa) a la concentración indicada. 24 horas después de la transfección, se aisló el ARN total con el Spin Cell Mini Kit 250 (Stratec). Los niveles del ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR en relación con la expresión del ARNm de *PPIB* en las muestras respectivas como transcripción de mantenimiento. Los valores se normalizaron a la cantidad de ARNm de *LPA* detectado en células no tratadas (intraplaca). Se transfectó un compuesto de ARNip sin silenciamiento como control adicional. Se muestran las medias
- 25 y la DT de los valores normalizados por triplicado. Los resultados se muestran en la figura 1.

Ejemplo comparativo 3

Respuesta a la dosis de compuestos de ARNip dirigidos a LPA no conjugados en la expresión del ARNm de *LPA* en células RT-4 humanas.

5 Las células del papiloma de células transicionales de vejiga humana RT4 se transfectaron inversamente como se describe anteriormente (Ejemplo 2) y se trataron a la concentración indicada (intervalo de 100 nM a 0,2 nM) con los diferentes compuestos de ARNip no conjugados (Tabla 1) como se indica. 24 h después de la transfección, el ARN total se aisló con el Spin Cell Mini Kit 250 (Stratec). Los niveles del ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR en relación con la expresión del ARNm de *PPIB* en las muestras respectivas como transcripción de mantenimiento. Los valores se normalizaron a la cantidad de ARNm de *LPA* detectado en células no tratadas. Las barras representan la expresión del ARNm de *LPA* restante para cada función de datos. Los resultados se muestran en la figura 2.

Ejemplo comparativo 4

15 Inhibición de la expresión del ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios humanos y de macaco mediante diferentes dosis de molécula de ARNip LPA-1038 conjugada con GalNAc-L1 administrada mediante captación mediada por receptor.

20 Los hepatocitos primarios (ThermoFisher) se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas de colágeno a densidades de 45.000 células por pocillo (de macaco) y 30.000 células por pocillo (humanas). Se añadió LPA-1038 conjugado con GalNAc-L1 inmediatamente después del cultivo en placas a las concentraciones indicadas (nM). 24 horas después del tratamiento con ARNip, se aisló el ARN total con el kit de 96 pocillos InviTrap RNA cell HTS (Stratec). Los niveles del ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR en relación con los niveles de ARNm de *actina* (macaco) o *APOB* (ser humano) en las muestras respectivas como transcripción de mantenimiento. Los valores se normalizaron a la expresión de *LPA* en células no tratadas. Las medias y la DT de los valores normalizados triplicados de los niveles del ARNm de *LPA* restantes se muestran como barras negras. Los resultados se muestran en la figura 3.

Ejemplo comparativo 5

30 Atenuación del ARNm de *LPA* en hepatocitos primarios humanos mediante los diferentes ARNip conjugados con L6-GalNAc indicados en hepatocitos primarios humanos tras la administración mediada por receptores.

35 Se sembraron hepatocitos primarios humanos (ThermoFisher) en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno a 30.000 células por pocillo (formato de 96 pocillos). Los ARNip conjugados con GalNAc-L6, incluido un control sin silenciamiento, se añadieron inmediatamente después de la siembra de células en las dos concentraciones indicadas. 24 horas después del tratamiento con ARNip, se aisló el ARN total con el kit de 96 pocillos InviTrap RNA cell HTS (Stratec). Los niveles de expresión del ARNm de *LPA* se determinaron mediante qRT-PCR en relación con el ARNm de *APOB* como transcripción de mantenimiento. Los valores se normalizaron a la expresión del ARNm de *LPA* en células no tratadas y los niveles del ARNm de *LPA* se representan por pares como barras (barras negras 100 nM, barras grises 20 nM). Las medias y la DT de los valores normalizados por triplicado se muestran en la figura 4.

Ejemplo comparativo 6 - Determinación *in vitro* de la atenuación de TTR de diversos conjugados de GalNAc de ARNip de TTR

45 Se sembraron hepatocitos primarios murinos en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con colágeno (Thermo Fisher Scientific, n.º A1142803) a una densidad celular de 30.000 células por pocillo y se trataron con conjugados de ARNip en concentraciones que variaban entre 10 nM y 0,0001 nM. 24 horas después del tratamiento, las células se lisaron y el ARN se extrajo con el kit InviTrap® RNA Cell HTS 96/C24 × 96 prep. (Stratec n.º 7061300400) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los niveles de transcripciones de TTR y ARNm de mantenimiento (PtenII) se cuantificaron mediante análisis TaqMan.

55 La expresión del gen diana en hepatocitos primarios murinos 24 horas después del tratamiento con los conjugados de la invención, conjugados 1 a 3, mostró que la expresión del gen diana disminuye a medida que aumenta la dosis del conjugado en comparación con los controles negativos (véase la columna "ST" y el conjugado de referencia 3), como se muestra en la figura 7. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, reduciendo así la expresión génica. En la figura 7 también se muestran los niveles de expresión del gen diana de los conjugados de referencia 1 y 2 que actúan como conjugados de comparación. Como puede observarse en una comparación entre los datos presentados en las figuras 7A y 7C, y 7B y 7C, los conjugados de la invención (Conjugados 1 a 3) disminuyen la expresión del gen diana en comparación con los conjugados de referencia 1 y 2. El conjugado más eficaz a 0,01 nM parece ser el conjugado 2. El conjugado más eficaz a 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM y 10 nM parece ser el conjugado 3.

Ejemplo comparativo 7 - Evolución temporal *in vivo* de TTR en suero en ratones

65 Se trataron s.c. ratones C57BL/6 con 1 mg/kg de conjugados de ARNip en el día 0. Se tomaron muestras de suero los días 7, 14 y 27 mediante sangrado del seno orbitario y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. La cuantificación

de TTR en suero se realizó con un ELISA de prealbúmina de ratón (ALPCO, 41-PALMS/lote 22, 2008003B) de acuerdo con el protocolo del fabricante (dilución de muestra 1:8000 o 1:800).

5 Los resultados de la evolución temporal de TTR en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 4 a los 7, 14 y 27 días después del tratamiento s.c. con los conjugados 1 a 3 1 mg/kg, los conjugados de referencia 1, 2 y 4, y los individuos tratados de forma simulada (PBS) se muestran en la figura 8. Como indican los datos de la figura 8, los conjugados de la invención son particularmente eficaces para reducir la expresión del gen diana en comparación con el control negativo (PBS) y los conjugados de referencia 1, 2 y, en particular, con el conjugado de referencia 4. Los conjugados 2 y 3 también son más eficaces que los conjugados de referencia 1, 2 y 4. El conjugado más eficaz es el conjugado 2. Por lo tanto, se puede esperar que el nivel de dosificación del conjugado 3 sea unas tres veces menor para lograr la misma reducción inicial y también dé como resultado una mayor duración de la atenuación en comparación con el conjugado de referencia 4.

15 De manera más específica, el conjugado 2 dio como resultado un nivel de proteína diana en suero 3 veces más bajo en el día siete y un nivel de proteína diana en suero 4 veces más bajo en el día 27 en comparación con el conjugado de referencia 4 a una dosis equimolar en ratones de tipo silvestre. Además, el conjugado 2 dio como resultado una reducción del 85 % del nivel de proteína diana en suero el día 27 después de la inyección única, en comparación con una reducción del 36 % por cantidad equimolar del conjugado de referencia 4.

20 Ejemplo comparativo 8

Respuesta a la misma dosis de atenuación para el ARNip de direccionamiento de *LPA* con dos unidades individuales de GalNAc conjugadas con la segunda cadena en comparación con una unidad triantenaria de GalNAc en la segunda cadena en 5' en hepatocitos primarios de macaco.

25 Los ARNip se modifican mediante la alteración de 2'-OMe/2'-F y contienen cada uno dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato (PS) en sus dos enlaces internucleotídicos terminales 5' y 3'. En el conjugado 19, cada una de las unidades de serinol-GalNAc está unida a través de un enlace PS al 5' y al 3' de la segunda cadena. En el conjugado 20, los dos internucleótidos en 5' terminales de la segunda cadena son fosfodiésteres y un enlazador GalNAc triantenaria está unido mediante un enlace PS a este extremo.

35 La respuesta a la dosis de la atenuación de *LPA* en los hepatocitos primarios de macaco se evaluó 24 horas después del tratamiento con ARNip 100, 20, 4, 0,8, 0,16, 0,032 y 0,006 nM. El control de referencia es la construcción 2, el control sin direccionamiento se denomina Cte. El valor ct de la transcripción para cada grupo de tratamiento se normalizó al valor ct de la transcripción para el gen *ACTB* de mantenimiento (Δ ct) y para los hepatocitos no tratados, llamado st ($\Delta\Delta$ ct).

Los datos se muestran en la figura 10

40 **Material y métodos:**

ARNip

SEQ ID NO:	nombre	lote	cadena	secuencia
135	Conjugado 19	X0373	X0373A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG
136			X0373B	Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)
135	Conjugado de referencia 9	STS20041L6	STS2041 A	mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG
137			STS2041 B	ST23 (ps) ST23 (ps) ST23 (ps) C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU
138	Conjugado de referencia 5 (CTR)	X0125	X0125A	mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA
139			X0125B	[(ST23 (ps)) ₃ (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG

Leyenda

mA, mU, mC, mG	ARN 2'-O-Metilo
fA, fU, fC, fG	ARN de 2'-desoxi-2'-fluoro
(ps)	fosforotioato
(po)	fosfodiéster

Cebador:

5

			SEQ ID NO
LPA	dir	GTGTCCTCGCAACGTCCA	48
	inv	GACCCCGGGGCTTTG	49
	sonda	BHQ1-TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG-FAM	140
ACTB	dir	GCATGGGTCAGAAGGATTCTAT	54
	inv	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT	55
	sonda	BHQ1-TCGAGCACGGCATCGTCACCAA-VIC	141

Métodos generalesExperimentos in vitro

10

Se descongelaron hepatocitos primarios murinos (Thermo Scientific: Lote GIBCO: n.º MC798) y se cambió el medio de crioconservación por medio Williams E complementado con FBS al 5 %, dexametasona 1 µM, Glutamax 2 mM, PenStrep al 1 %, insulina recombinante humana 4 mg/ml, Hepes 15 mM. La densidad celular se ajustó a 250000 células por 1 ml. Se sembraron 100 µl por pocillo de esta suspensión celular en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con colágeno. El artículo de prueba se diluyó previamente en el mismo medio (concentrado 5 veces) para cada concentración y se añadieron a las células 25 µl de este ARNip diluido previamente o solo medio. Las células se cultivaron a 37 °C y CO₂ al 5 %. 24 h después del tratamiento, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron en PBS frío y se añadieron 250 µl de tampón de lisis de ARN S (Stratec). Después de 15 min de incubación a temperatura ambiente, las placas se almacenaron a -80 °C hasta el aislamiento del ARN de acuerdo con el protocolo del fabricante.

15

20

Análisis TaqMan

25

Para el análisis múltiple TaqMan de mTTR y PTEN, se mezclaron 10 µl de ARN aislado para cada grupo de tratamiento con 10 µl de mezcla maestra de PCR (TAKYON low Rox) que contenía cebador mTTR 600 nM, cebador ApoB 400 nM y 200 nM de cada sonda, así como 0,5 unidades de polimerasa Euroscript II RT con 0,2 unidades de inhibidor de ARNasa. El análisis TaqMan se realizó en una placa de 384 pocillos con una etapa de RT de 10 min a 48 °C, desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C y 40 ciclos de 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 1 min. Los cebadores contienen dos de BHQ1, FAM e YY, una en cada extremo de la secuencia.

30

35

Para el análisis TaqMan multiplexado de TMPRSS6 y ApoB, se mezclaron 10 µl de ARN aislado para cada grupo de tratamiento con 10 µl de mezcla maestra de PCR (TAKYON low Rox) que contenía cebador TMPRSS6 800 nM, cebador ApoB 100 nM y 200 nM de cualquiera de las sondas, así como 0,5 unidades de polimerasa Euroscript II RT con 0,2 unidades de inhibidor de ARNasa. El análisis TaqMan se realizó en una placa de 384 pocillos con una etapa de RT de 10 min a 48 °C, desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C y 40 ciclos de 95 °C durante 10 s y 60 °C durante 1 min.

Experimentos in vivo

40

Para comparar la potencia *in vivo* de diferentes conjugados de ARNip se administró por vía subcutánea ARNip 1 mg/kg disuelto en PBS en la región escapular de ratones c57BL/6. Las cohortes de n = 6 se trataron con ARNip de direccionamiento de *Aldh2* o *Tmprss6* en el día 1 y se sacrificaron en puntos temporales seleccionados después del tratamiento. Las muestras de hígado se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del ARN con el kit InviTrap Spin Tissue RNA Mini (Stratec) de acuerdo con el manual del fabricante. A continuación, se cuantificaron los niveles de transcripción de *Aldh2*, *Tmprss6* y *Pten* como se describió anteriormente.

45

Ensayo de estabilidad en tritosomas

50

Para comprobar la estabilidad de la ARNasa en el compartimento endosómico/lisosómico de las células hepáticas *in vitro* se incubó ARNip durante 0 h, 4 h, 24 h o 72 h en tritosomas de hígado de rata Sprague Dawley (Tebu-Bio, n.º de catálogo: R0610.LT, lote: 1610405, pH: 7,4, 2,827 unidades/ml). Para imitar el entorno acidificado, los tritosomas se mezclaron 1:10 con tampón de pH bajo (ácido acético 1,5 M, acetato de sodio 1,5 M, pH 4,75). 30 µl de estos tritosomas acidificados. Después se mezclaron 10 µl de ARNip (20 µM) y se incubaron durante los tiempos indicados a 37 °C. Después de la incubación, se aisló el ARN con los cartuchos del kit de inicio Clarity OTX (Phenomenex n.º de

55

cat.: KSO-8494) de acuerdo con el protocolo del fabricante para líquidos biológicos. El ARN liofilizado se reconstituyó en 30 µl de H₂O, se mezclaron con tampón de carga 4× y se cargaron 5 µl en una electroforesis en gel de poli(acrilamida) (PAGE) TBE al 20 % para el análisis semicuantitativo cualitativo de separación. La PAGE se ejecutó a 120 V durante 2 h y el ARN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio con toma de imágenes digitales posteriores con un sistema de imágenes Biorad.

Ejemplo comparativo 9 - Síntesis de conjugados

Los compuestos ilustrativos se sintetizaron de acuerdo con los métodos que se describen a continuación y los métodos conocidos por los expertos en la materia. El ensamblaje de la cadena de oligonucleótidos y los bloques de construcción enlazadores se realizó mediante síntesis en fase sólida aplicando la metodología de fosforamidita. La conjugación de GalNAc se logró mediante la formación de enlaces peptídicos de un bloque de construcción de ácido carboxílico de GalNAc con el oligonucleótido purificado y ensamblado previamente que tenía unido el número necesario de bloques de construcción enlazadores modificados con amino.

La síntesis, la desprotección y la purificación de oligonucleótidos siguieron los procedimientos convencionales que se conocen en la materia.

Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador oligopiloto AKTA usando química convencional de fosforamidita. Se utilizaron soporte sólido disponible en el mercado y fosforamiditas de 2'-O-Metilo ARN, 2'-Fluoro, fosforamiditas de 2'-desoxi ARN (toda la protección convencional, ChemGenes, LinkTech) y modificador 3'-Amino TFA Amino C-6 Icaa CPG 500Å (Chemgenes) comercialmente disponible, Fmoc-Amino-DMT C-7 CE fosforamidito (GlyC3Am), modificador 3'-amino C-3 Icaa CPG 500Å (C3Am), Fmoc-Amino-DMT C-3 CED fosforamidita (C3Am) y TFA-Amino C-6 CED fosforamidita (C6Am) (Chemgenes), modificador 3'-Amino C7 CPG (C7Am) (Glen Research), TFA aminofosforamidito no nucleosídico (Pip), TFA amino no nucleosídico (PipAm) (AM Chemicals). La galactosa amina peracetilada 8 está disponible comercialmente.

Los reactivos auxiliares se adquirieron de EMP Biotech. La síntesis se realizó utilizando una solución 0,1 M de la fosforamidita en acetonitrilo seco y se utilizó benciltiotetrazol (BTT) como activador (0,3 M en acetonitrilo). El tiempo de acoplamiento fue de 15 min. Se aplicó un ciclo Cap/OX/Cap o Cap/Thio/Cap (Cap: Ac₂O/NMI/lutidina/acetonitrilo, oxidante: I₂ 0,1 M en piridina/H₂O). Se introdujeron fosforotioatos mediante reactivos de tiolación convencionales disponibles en el mercado (EDITH, tecnologías Link). La escisión de DMT se logró mediante el tratamiento con ácido dicloroacético al 3 % en tolueno. Al finalizar los ciclos de síntesis programados se realizó un lavado con dietilamina (DEA). Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en modo DMT en suspensión.

La unión del resto enlazador procedente de serinol se logró mediante el uso de (S)-DMT-Serinol(TFA)-succinato-Icaa-CPG **10** cargado con base o una fosforamidita de (S)-DMT-Serinol(TFA) **7** (la síntesis se realizó como se describe en la bibliografía de Hoevelmann *et al.* Chem. Sci., 2016,7, 128-135). Los grupos de GalNAc de tres antenas (ST23/C4XLT o ST23/C6XLT) se introdujeron mediante el acoplamiento sucesivo de los respectivos derivados de amidita de trebler (C4XLT-phos o C6XLT-phos) seguidos de la amidita de GalNAc (ST23-phos).

La unión de restos modificados con amino (enlazadores no procedentes de serinol) se logró mediante el uso de los bloques de construcción CPG modificados con amino comercialmente disponibles o amidita.

Las cadenas se escindieron de la CPG en un tratamiento con metilamina ac. al 40 %. El oligonucleótido bruto resultante se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (Resource Q, 6 ml, GE Healthcare) en un sistema de HPLC AKTA Pure utilizando un gradiente de cloruro de sodio. Las fracciones que contenían producto se agruparon, se desalaron en una columna de exclusión por tamaño (Zetadex, EMP Biotech) y se liofilizaron.

Las cadenas simples individuales se disolvieron en una concentración de 60 DO/ml en H₂O. Ambas soluciones de oligonucleótidos individuales se añadieron juntas en un recipiente de reacción. Para facilitar el seguimiento de la reacción, se realizó una valoración. La primera cadena se añadió en un exceso del 25 % sobre la segunda cadena, según lo determinado por la absorción UV a 260 nm. La mezcla de reacción se calentó a 80 °C durante 5 min y después se enfrió lentamente a TA. La formación de doble cadena se controló mediante HPLC de fase inversa de emparejamiento de iones. A partir del área UV de la cadena única residual se calculó la cantidad necesaria de la segunda cadena y se añadió a la mezcla de reacción. La reacción se calentó de nuevo a 80 °C y se enfrió despacio a TA. Este procedimiento se repitió hasta que se detectó menos del 10 % de cadena única residual.

Síntesis de los compuestos 2 a 10

Los compuestos **2 a 5** y (S)-DMT-Serinol(TFA)-fosforamidita **7** se sintetizaron de acuerdo con los métodos publicados en la bibliografía (Hoevelmann *et al.* Chem. Sci., 2016,7, 128-135).

Ácido (S)-4-(3-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-2-(2,2,2-trifluoroacetamido)propoxi)-4-oxobutanoico (6).

A una solución de **5** en piridina se añadió anhídrido succínico, seguido de DMAP. La mezcla resultante se agitó a

temperatura ambiente durante una noche. Todo el material de partida se consumió, según lo juzgado por TLC. La reacción se concentró. El material bruto se cromatografió en gel de sílice utilizando un gradiente del 0 % al 5 % de metanol en DCM (+ trietilamina al 1 %) para proporcionar 1,33 g de **6** (rendimiento = 38 %). m/z (ESI⁻): 588,2 (100 %), (calculado para C₃₀H₂₉F₃NO₈⁻ [M-H]⁻: 588,6). 1 H-NMR: (400 MHz, CDCl₃) δ [ppm] = 7,94 (d, 1H, NH), 7,39 - 7,36 (m, 2H, CHarilo), 7,29 - 7,25 (m, 7H, CHarilo), 6,82-6,79 (m, 4H, CHarilo), 4,51 - 4,47 (m, 1H), 4,31 - 4,24 (m, 2H), 3,77 (s, 6H, 2xDMTr-OMe), 3,66 - 3,60 (m, 16H, HNET₃⁺), 3,26 - 3,25 (m, 2H), 2,97 - 2,81 (m, 20H, NET₃), 2,50-2,41 (4H, m), 1,48 - 1,45 (m, 26H, HNET₃⁺), 1,24 - 1,18 (m, 29H, NET₃).

(S)-DMT-Serinol(TFA)-succinato-lcaa-CPG (**10**)

El (S)-DMT-Serinol(TFA)-succinato (159 mg, 270 μmol) y HBTU (113 mg, 299 μmol) se disolvieron en CH₃CN (10 ml). Se añadió diisopropiletilamina (DIPEA, 94 μl, 540 μmol) a la solución y la mezcla se agitó durante 2 min seguido de la adición de amino-lcaa-CPG natural (500 A, 3 g, contenido de amina: 136 mol/g). La suspensión se agitó suavemente a temperatura ambiente en un agitador de muñeca durante 16 h, después se filtró y se lavó con DCM y EtOH. El soporte sólido se secó al vacío durante 2 h. Las aminas que no reaccionaron en el soporte se protegieron mediante agitación con anhídrido acético/lutidina/N-metilimidazol a temperatura ambiente. El lavado del soporte se repitió como anteriormente. El sólido se secó al vacío para producir un soporte sólido **10** (3 g, carga de 26 μmol/g).

Sintón de GalNAc (**9**)

La síntesis del sintón de GalNAc **9** se realizó como se describe en Nair *et al.* J. Am. Chem. Soc., 2014, 136 (49), págs. 16958-16961, en un rendimiento del 46 % en dos etapas.

Los datos de caracterización coincidieron con los datos publicados.

Síntesis de oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos monocatenarios se sintetizaron de acuerdo con las condiciones de reacción descritas anteriormente y en las figuras 5 y 6, y se describen en las tablas 3 y 4.

Todos los productos monocatenarios finales se analizaron mediante AEX-HPLC para probar su pureza. La pureza se expresa en % FLP (% de producto de longitud completa, *full length product*) que es el porcentaje del área UV bajo la señal de producto asignada en el trazado UV del análisis AEX-HPLC del producto final. La identidad de los respectivos productos monocatenarios (precursores no modificados, modificados con amino u oligonucleótidos conjugados con GalNAc) se demostró mediante análisis LC-MS.

Tabla 3: Oligonucleótidos monocatenarios no conjugados

Producto (11)	Nombre	PM calc.	PM (ESI) encontrado	%FLP (AEX-HPLC)
A0002	STS16001A	6943,3 Da	6943,0 Da	86,6 %
A0006	STS16001BL4	8387,5 Da	8387,5 Da	94,1 %
A0114	STS22006A	6143,8 Da	6143,7 Da	94,3 %
A0115	STS22006BL1	7855,1 Da	7855,1 Da	92,8 %
A0122	STS22009A	6260,9 Da	6260,6 Da	92,8 %
A0123	STS22009BL1	7783,0 Da	7782,9 Da	87,1 %
A0130	STS18001A	6259,9 Da	6259,8 Da	76,5 %
A0131	STS18001BL4	7813,2 Da	7813,1 Da	74,3 %
A0220	STS16001B-5'1xNH2	6982,2 Da	6982,1 Da	95,7 %
A0237	STS16001A	6943,3 Da	6943,3 Da	95,6 %
A0244	STS16001BV1	6845,2 Da	6844,9 Da	98,2 %
A0264	STS16001AV4-3'1xNH2	7112,4 Da	7112,2 Da	95,4 %
A0329	STS16001BV6-3'5'1xNH2	7183,3 Da	7183,2 Da	88,8 %
A0560	STS16001A	6943,3 Da	6943,3 Da	96,7 %
A0541	STS16001BV1-3'5'NH2	7151,3 Da	7151,0 Da	85,6 %
A0547	STS16001BV16-3'5'NH2	7119,3 Da	7119,1 Da	89,9 %
A0617	STS16001BV20-3'5'NH2	7087,3 Da	7086,7 Da	90,1 %
A0619	STS16001BV1-3'5'2xNH2	7521,3 Da	7521,3 Da	93,4 %
A0680	STS16001A	6943,3 Da	6942,9 Da	91,2 %
A0514	STS22006A	6143,8 Da	6143,7 Da	94,6 %
A0516	STS22009BV11-3'5'NH2	6665,0 Da	6664,8 Da	87,0 %
A0517	STS22009BV11-3'5'NH2	6593,0 Da	6593,0 Da	86,0 %
A0521	STS12009BV1-3'5'NH2	6437,7 Da	6437,8 Da	91,1 %

(continuación)

Producto (11)	Nombre	PM calc.	PM (ESI) encontrado	%FLP (AEX-HPLC)
A0303	STS12209BL4	7665,0 Da	7664,9 Da	90,4 %
A0304	STS12209A	6393,1 Da	6392,9 Da	77,6 %
A0319	STS22009A	6260,9 Da	6260,5 Da	86,9 %
A0353	STS12009A	6416,1 Da	6416,1 Da	94,1 %
A0216	STS17001A	6178,8 Da	6178,7 Da	87,2 %
A0217	STS17001BL6	7937,2 Da	7937,2 Da	78,3 %

5 5'1 x NH₂ se refiere a la posición (extremo 5') y el número (1 x NH₂) de grupos amino procedentes de serinol libres que están disponibles para la conjugación. Por ejemplo, 1x3'NH₂ en **A0264** significa que hay un grupo amino libre que puede reaccionar con el sintón de GalNAc **9** en el extremo 3' de la cadena **A0264**. 3'5'1xNH₂ significa que hay un grupo amino libre procedente del serinol que puede reaccionar con el enlazador de GalNAc **9** en el extremo 3' y el extremo 5' de la cadena.

Tabla 4: Oligonucleótidos monocatenarios con modificaciones en 5' y 3'

Producto	Nombre	5'mod	3'mod	PM calc.	PM (ESI) encontrado	%FLP (AEX-HPLC)
A0561	STS16001BV1-3'5'1xNH ₂	C6Am	GlyC3Am	7267,5 Da	7267,5 Da	66,7 %
A0563	STS16001BV1-3'5'1xNH ₂	C3Am	C3Am	7183,4 Da	7183,1 Da	75,1 %
A0651	STS16001BV1-3'5'1xNH ₂	C6Am	C7Am	7265,6 Da	7265,2 Da	99,6 %
A0653	STS16001BV1-3'5'1xNH ₂	GlyC3Am	GlyC3Am	7299,5 Da	7299,3 Da	88,1 %
A0655	STS16001BV1-3'5'1xNH ₂	PipAm	PipAm	7517,7 Da	7517,5 Da	89,8 %

10 De forma similar, 3'5'1 x NH₂ se refiere a la posición (extremo 3' y 5') y número (1 x NH₂ cada uno) de grupos amino libres que están disponibles para la conjugación. Por ejemplo, 3'5'1xNH₂ en **A0561** significa que hay 2 grupos amino libres (1 en el extremo 3' y 1 en el extremo 5') que pueden reaccionar con el sintón de GalNAc **9** en el extremo 3' de la cadena **A0561**.

15 Síntesis de determinados conjugados y conjugados de referencia 1 a 2

La conjugación del sintón de GalNAc (**9**) se logró mediante el acoplamiento a la función serinol-amino de la respectiva cadena de oligonucleótidos **11** utilizando un reactivo de acoplamiento peptídico. Por lo tanto, la respectiva molécula precursora modificada con amino **11** se disolvió en H₂O (500 DO/ml) y se añadió DMSO (DMSO/H₂O, 2/1, v/v), seguido de DIPEA (2,5 % del volumen total). En un recipiente de reacción separado se realizó la preactivación del ácido GalN(Ac₄)-C₄ (**9**) haciendo reaccionar 2 eq. (por función amino en el oligonucleótido precursor modificado con amino **11**) del componente de ácido carboxílico con 2 eq. de HBTU en presencia de 8 eq. de DIPEA en DMSO. Después de 2 min el compuesto preactivado **9** se añadió a la solución de la respectiva molécula precursora modificada con amino. Después de 30 min, el progreso de la reacción se controló mediante LCMS o AEX-HPLC. Una vez completada la reacción de conjugación, el producto bruto se precipitó mediante la adición de 10x iPrOH y NaCl 0,1x 2 M y se recogieron mediante centrifugación y decantación. Para liberar los grupos hidroxilo acetilados en los restos de GalNAc, el sedimento resultante se disolvió en MeNH₂ al 40 % (1 ml por 500 DO) y después de 15 min a TA se diluyó en H₂O (1:10) y finalmente se purificó de nuevo mediante intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño y se liofilizó para producir el producto final **12** (Tabla 5).

Tabla 5: Oligonucleótidos monocatenarios conjugados con GalNAc

Producto (12)	Material de partida	Nombre	PM calc.	PM (ESI) encontrado	%FLP (AEX-HPLC)
A0241	A0220	STS16001BL20	7285,5 Da	7285,3 Da	91,8 %
A0268	A0264	STS16001AV4L33	7415,7 Da	7415,4 Da	96,9 %
A0330	A0329	STS16001BV6L42	7789,8 Da	7789,8 Da	95,5 %
A0544	A0541	STS16001BV1L75	7757,9 Da	7757,7 Da	93,3 %
A0550	A0547	STS16001BV16L42	7725,9 Da	7725,7 Da	88,5 %
A0620	A0617	STS16001BV20L75	7693,91 Da	7693,2 Da	90,9 %
A0622	A0619	STS16001BV1L94	8734,3 Da	8734,6 Da	82,9 %
A0519	A0516	STS22006BV11L42	7271,7 Da	7271,7 Da	90,0 %
A0520	A0517	STS22009BV11L42	7199,6 Da	7199,7 Da	92,9 %
A0522	A0521	STS12009BV1L42	7044,4 Da	7044,4 Da	96,0 %
A0603	A0602	STS20041BV1L42	7280,7 Da	7280,4 Da	93,4 %

Síntesis de determinados conjugados de la invención

- 5 La conjugación del sintón de GalNAc (**9**) se logró mediante el acoplamiento a la función amino de la respectiva cadena de oligonucleótidos **14** utilizando un reactivo de acoplamiento peptídico. Por lo tanto, la respectiva molécula precursora modificada con amino **14** se disolvió en H₂O (500 DO/ml) y se añadió DMSO (DMSO/H₂O, 2/1, v/v), seguido de DIPEA (2,5 % del volumen total). En un recipiente de reacción separado se realizó la preactivación del ácido GalN(Ac₄)-C4 (**9**) haciendo reaccionar 2 eq. (por función amino en el oligonucleótido precursor modificado con amino **14**) del componente de ácido carboxílico con 2 eq. de HBTU en presencia de 8 eq. de DIPEA en DMSO. Después de 2 min el compuesto preactivado **9** se añadió a la solución de la respectiva molécula precursora modificada con amino. Después de 30 min, el progreso de la reacción se controló mediante LCMS o AEX-HPLC. Una vez completada la reacción de conjugación, el producto bruto se precipitó mediante la adición de 10× iPrOH y NaCl 0,1× 2 M y se recogieron mediante centrifugación y decantación. Para liberar los grupos hidroxilo acetilados en los restos de GalNAc, el sedimento resultante se disolvió en MeNH₂ al 40 % (1 ml por 500 DO) y después de 15 min a TA se diluyó en H₂O (1:10) y finalmente se purificó de nuevo mediante intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño y se liofilizó para producir el producto final **15** (Tabla 6).

Tabla 6: Oligonucleótidos monocatenarios conjugados con GalNAc

Producto (15)	Material de partida	Nombre	PM calc.	PM (ESI) encontrado	%FLP (AEX-HPLC)
A0562	A0561	STS16001BV1L87	7874,2 Da	7874,0 Da	82,7 %
A0564	A0563	STS16001BV1L88	7790,0 Da	7789,4 Da	90,4 %
A0652	A0651	STS16001BV1L96	7872,2 Da	7871,8 Da	94,6 %
A0654	A0653	STS16001BV1L97	7906,2 Da	7905,6 Da	89,9 %
A0656	A0655	STS16001BV1L98	8124,3 Da	8124,0 Da	93,6 %

20 Formación de doble cadena

La formación de doble cadena se realizó de acuerdo con los métodos descritos anteriormente.

- 25 La pureza de doble cadena se da en % de doble cadena, que es el porcentaje del área UV bajo la señal de producto asignada en el trazado UV del análisis IP-RP-HPLC (Tabla 7).

Tabla 7: Conjugados de ácido nucleico

Producto	Materiales de partida		Nombre	% de doble cadena
	Primera cadena	Segunda cadena		
Conj. de ref. 1	A0237	A0241	STS16001L20	97,7 %
Conj. de ref. 2	A0268	A0244	STS16001L33	97,8 %
Conj. de ref. 3	A0130	A0131	STS18001L4	96,8 %
Conj. de ref. 4	A0002	A0006	STS16001L4	90,1 %
Conj. de ref. 5	A0216	A0217	STS17001L6	88,4 %
Conjugado 1	A0268	A0241	STS16001L24	96,0 %
Conjugado 2	A0237	A0330	STS16001V1L42	98,5 %
Conjugado 3	A0268	A0330	STS16001V1L43	98,2 %
Conjugado 4	A0560	A0544	STS16001V1L75	92,5 %
Conjugado 5	A0560	A0550	STS16001V16L42	95,3 %
Conjugado 6	A0237	A0620	STS16001V20L75	97,8 %
Conjugado 7	A0237	A0622	STS16001V1L94	93,7 %
Conjugado 8	A0680	A0652	STS16001V1L96	98,4 %
Conjugado 9	A0680	A0654	STS16001V1L97	95,8 %
Conjugado 10	A0680	A0656	STS16001V1L98	97,6 %
Conjugado 11	A0560	A0564	STS16001V1L88	95,0 %
Conjugado 12	A0237	A0562	STS16001V1L87	96,8 %
Conjugado 13	A0114	A0115	STS22006L1	85,6 %
Conjugado 14	A0122	A0123	STS22009L1	96,4 %

(continuación)

Producto	Materiales de partida		Nombre	% de doble cadena
	Primera cadena	Segunda cadena		
Conj. de ref. 1	A0237	A0241	STS16001L20	97,7 %
Conjugado 15	A0514	A0519	STS22006V11L42	98,6 %
Conjugado 16	A0319	A0520	STS22009V11L42	97,0 %
Conjugado 17	A0304	A0303	STS12209L4	93,0 %
Conjugado 18	A0353	A0522	STS12009V1L42	98,0 %
Conjugado 19	A0601	A0603	STS20041BL42	97,6 %

Secuencias

5 Claves de modificaciones para las siguientes secuencias:

f indica 2'Fluoro 2'desoxirribonucleótido o 2'-fluoro ribonucleótido (los términos son intercambiables)

m indica 2'O Metil ribonucleótido

(ps) indica enlace de fosforotioato

10 FAM = 6-Carboxifluoresceína

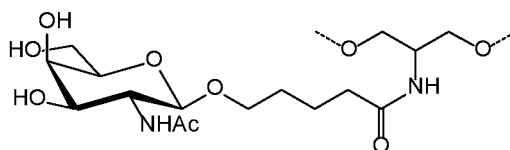
BHQ = *Black Hole Quencher 1*, desactivador oscuro 1

YY = *Yakima Yellow*, Amarillo Yakima

Definiciones

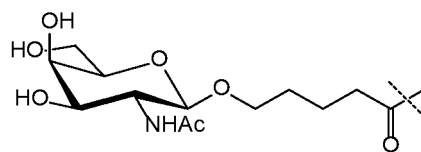
15

Ser(GN) es un bloque de construcción de GalNAc-C4 unido al resto enlazador procedente de serinol:



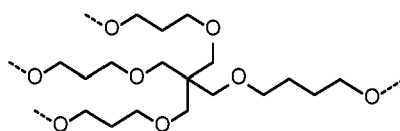
20 en donde el O--- es el enlace entre el átomo de oxígeno y, por ejemplo, H, el enlace fosforodiéster o el enlace fosforotioato.

GN es:



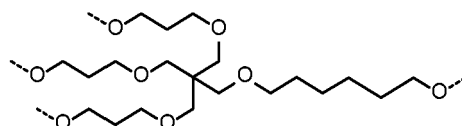
25

C4XLT es:

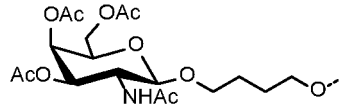


30

C6XLT es:

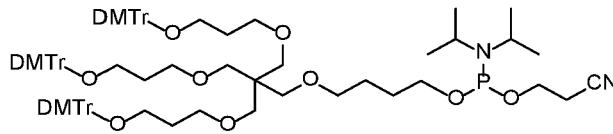


ST23 es:



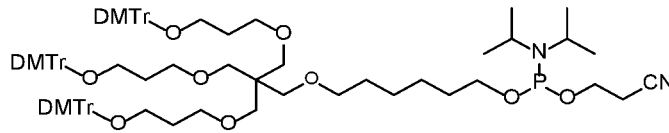
5 La síntesis de los derivados de fosoramidita de C4XLT (C4XLT-phos), C6XLT (C6XLT-phos) así como ST23 (ST23-phos) se puede realizar como se describe en el documento WO2017/174657.

C4XLT-phos:



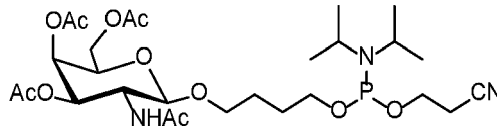
10

C6XLT-phos:



15

ST23-phos:



<p>C3Am es:</p>	<p>ltrb es:</p>	<p>GlyC3Am es:</p>
<p>C6Am es:</p>	<p>Pip Am es:</p>	<p>C7Am es:</p>

20

en donde G = H (antes de la conjugación) o G = GN (después de la conjugación).

Conjugado 1

25

Cadena de antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU (ps) Ser(GN) 3'

Cadena de sentido - STS16001BL20 (SEQ ID NO: 128)

5' Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA 3'

5

Conjugado 2

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU

10

Cadena de sentido - STS16001BV1L42 (SEQ ID NO: 130)

Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps)
Ser(GN)

15 Conjugado 3

Cadena de antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU (ps) Ser(GN) 3'

20

Cadena de sentido - STS16001BV1L42 (SEQ ID NO: 130)

5' Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps)
Ser(GN) 3'

25

Conjugado 4

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU

30

Cadena de sentido - STS16001BV1L75 (SEQ ID NO: 142)

5' Ser(GN) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA Ser(GN) 3'

35 Conjugado 5

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU

Cadena de sentido - STS16001BV16L42 (SEQ ID NO: 143)

40 5' Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA (ps) Ser(GN) 3'

Conjugado 6

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU

45

Cadena de sentido - STS16001BV20L75 (SEQ ID NO: 144)

5' Ser(GN) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU mA fA Ser(GN) 3'

50 Conjugado 7

Cadena de antisentido - (SEQ ID NO: 129)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU

Cadena de sentido - STS16001BV1L94 (SEQ ID NO: 145)

55

5' Ser(GN) (ps) Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA
(ps) fA (ps) Ser(GN) (ps) Ser(GN) 3'

Conjugado 8

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

60

Cadena de sentido - STS16001V1BL96 (SEQ ID NO: 146)

65

5' C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C7Am(GN) 3'

Conjugado 9

5 Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

10 Cadena de sentido - STS16001V1BL97 (SEQ ID NO: 147)

5' GlyC3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN) 3'

15 Conjugado 10

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

20 Cadena de sentido (SEQ ID NO: 148)

5' PipAm(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) PipAm(GN) 3'

25 Conjugado 11

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

30 Cadena de sentido - STS16001V1BL88 (SEQ ID NO: 149)

5' C3Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) C3Am(GN) 3'

35 Conjugado 12

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)

5' mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU 3'

Cadena de sentido - STS16001V1BL87 (SEQ ID NO: 150)

45 5' C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN) 3'

Conjugado 15

50 Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 151)
mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC
Cadena de sentido (SEQ ID NO: 152)

Ser(GN) (ps) fG (ps) mA (ps) fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA (ps) Ser(GN)

55 Conjugado 16

60 Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 153)
mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps) mU
Cadena de sentido (SEQ ID NO: 154)

Ser(GN) (ps) fA (ps) mG (ps) fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)

Conjugado 18

65 Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 155)

ES 2 932 295 T3

mA (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA
Cadena de sentido (SEQ ID NO: 156)

Ser(GN) (ps) fU (ps) mC (ps) fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fU (ps) Ser(GN)

5

Conjugado 19

Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 135) mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps)
fC (ps) mG

10 Cadena de sentido (SEQ ID NO: 136)

Ser(GN) (ps) fC (ps) mG (ps) fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)

Conjugado de referencia 1

15

Cadena de antisentido - STS16001A (SEQ ID NO: 129)
mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU
Cadena de sentido - STS16001BL20 (SEQ ID NO: 128)

20 Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (PS) fA

Conjugado de referencia 2

25

Cadena de antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)

mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU (ps) Ser(GN)

Cadena de sentido - STS16001BV1 (SEQ ID NO: 157)
fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA

30

Conjugado de referencia 3 - "Luc"

Cadena de antisentido - STS18001A (A0130, SEQ ID NO: 132)
mU (ps) fC (ps) mG fA mA fG mU fA mU fU mC fC mG fC mG fU mA (ps) fC (ps) mG
Cadena de sentido - STS18001BL4 (A0131, SEQ ID NO: 133)

35

[(ST23) (ps)]₃ C4XLT (ps) fC mG fU mA fC mG fC mG fG mA fA mU fA mC fU mU fC (ps) mG (ps) fA

Conjugado de referencia 4

40

Cadena de antisentido - STS16001AL33 (SEQ ID NO: 127)
mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU
Cadena de sentido - STS16001BL4 (SEQ ID NO: 134)

45 5'[(ST23) (ps)]₃ C4XLT(ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps)
fA

Conjugado de referencia 5 - "Ctr"

50

Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 138)
mC (ps) fU (ps) mU fA mC fU mC fU mC fG mC fC mC fA mA fG mC (ps) fG (ps) mA
Cadena de sentido (SEQ ID NO: 139)

[(ST23) (ps)]₃ (C6XLT) (ps) fU mC fG mC fU mU fG mG fG mC fG mA fG mA fG mU fA (ps) mA (ps) fG

55

Conjugado de referencia 6

Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 151)
mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC
Cadena de sentido (SEQ ID NO: 158)

60

[ST23 (ps)]₃ ltrb (ps) fG mA fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (PS) fA

Conjugado de referencia 7

65

Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 153)

mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps) mU
Cadena de sentido (SEQ ID NO: 159)

[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fA mG fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU

5

Conjugado de referencia 8

Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 160)

mU (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA

10

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 161)

[ST23 (ps)]3 ST41 (ps)fU mC fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (PS) fA

Conjugado de referencia 9

15

Cadena de antisentido (SEQ ID NO: 135)

mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG

Cadena de sentido (SEQ ID NO: 162)

20

[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU

Ejemplo comparativo 10 - Determinación *in vitro* de la atenuación de TTR de varios ARNip de TTR

Conjugados GalNAc

25

Conjugados 4 a 7

El método se describió anteriormente en "experimentos *in vitro*" en la sección de Método general.

30

La expresión del gen diana en hepatocitos primarios murinos 24 horas después del tratamiento a 0,01 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM y 10 nM con los conjugados de la invención, los conjugados 4 a 7, mostró que la expresión del gen diana disminuye a medida que aumenta la dosis del conjugado en comparación con los controles negativos (véase la columna "ST" y Luc [Conjugado de referencia 3]), como se muestra en la figura 11. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, reduciendo así la expresión génica.

35

Los datos *in vitro* muestran que en el contexto de uno o dos restos enlazadores procedentes de serinol que se proporcionan en los extremos 5' y 3' de la cadena de sentido en los conjugados 4 a 7, el número de enlaces de fosforotioato (PS) entre el nucleótido terminal y el enlazador, y/o entre los tres nucleótidos terminales en la cadena de sentido, puede variarse manteniendo la eficacia para disminuir la expresión del gen diana.

40

Conjugados 8 a 12 y 19

El método se describió anteriormente en "experimentos *in vitro*" en la sección de Método general.

45

La expresión del gen diana en hepatocitos primarios murinos 24 horas después del tratamiento a 0,01 nM, 0,1 nM, 0,5 nM, 1 nM y 10 nM con los conjugados de la invención, los conjugados 8 a 12, mostró que la expresión del gen diana disminuye a medida que aumenta la dosis del conjugado en comparación con los controles negativos (véase la columna "ST" y Luc [Conjugado de referencia 3]), como se muestra en la figura 12. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, reduciendo así la expresión génica. En particular, Los conjugados 8, 9, 10 y 11 parecen ser comparables o mejores que el conjugado 2, que previamente demostró ser el conjugado más eficaz a 0,01 nM.

50

También se demostró que el conjugado 19 disminuía la expresión del gen diana en comparación con los controles negativos (véase la columna "ST" y Ctr, que es un ARNip sin direccionamiento y también denominado conjugado de referencia 5), como se muestra en la figura 13. Esto indica que la primera cadena se une al gen diana, reduciendo así la expresión génica.

55

Los datos *in vitro* para los conjugados 8 a 12 y 19 muestran que una serie de enlazadores que son estructuralmente diversos y que están conjugados en ambos extremos de la cadena de sentido son eficaces para disminuir la expresión del gen diana. Los conjugados 8 a 12 y 19 disminuyen la expresión del gen diana de manera más eficaz que "Luc", que es el conjugado de referencia 3 (para los conjugados 8 a 12), "Ctr", que es el conjugado de referencia 5 (para el conjugado 19) y el control sin tratamiento.

60

Ejemplo comparativo 11 - Evolución temporal *in vivo* de *Ttr*, *Aldh2* y *Tmprss6* en suero en ratones

65

Conjugados 15 a 18

El método se describió anteriormente en "experimentos *vivo*" en la sección de Método general.

5 Los resultados de la evolución temporal de *Aldh2* en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg de los conjugados 15 y 16, los conjugados de referencia 6 y 7, y los individuos tratados de forma simulada (PBS) se muestran en las figuras 14 y 15. Como se sugiere por los datos de las figuras 14 y 15, los conjugados de la invención son particularmente eficaces para reducir la expresión del gen diana en comparación con el control negativo (PBS) y los conjugados de referencia 6 y 7 respectivamente.

10 Los resultados de la evolución temporal de *Tmprss6* en suero en cohortes de ratones c57BL/6 de n = 6 a los 14, 28 y 42 días después del tratamiento s.c. con 1 mg/kg del conjugado 18, el conjugado de referencia 8 y los individuos tratados de forma simulada (PBS) se muestran en la figura 16. Como indican los datos de la figura 16, los conjugados de la invención son particularmente eficaces para reducir la expresión del gen diana en comparación con el control negativo (PBS) y el conjugado de referencia 8.

15 En general, los datos *in vivo* muestran que varios enlazadores ilustrativos que se conjugan en ambos extremos de la segunda cadena son eficaces para disminuir la expresión del gen diana *in vivo*. El posicionamiento del enlazador mejora la potencia *in vivo* de los conjugados, en comparación con un control de enlazador GalNAc triantenario en el extremo 5' de la segunda cadena (Conjugados de referencia 6, 7 y 8).

20 Ejemplo comparativo 12 - Estudios de estabilidad en suero

Se siguió el método descrito anteriormente en "Ensayo de estabilidad en tritosomas" en la sección Método general.

25 En la figura 17 se muestran los resultados de los estudios de estabilidad en suero con respecto a los conjugados 2, 4, 5, 6 y 7. E la figura 18 se muestra la estabilidad en suero de los conjugados 2, 8, 9, 10, 11 y 12.

Todos los conjugados de la invención que se probaron son más estables en suero en comparación con el control.

30 Todos los conjugados probados contienen cada uno una unidad enlazadora de GalNAc en el extremo 5' y otra en el extremo 3' de la segunda cadena. Los ARNip se modifican mediante la alteración de 2'-OMe/2'-F y contienen cada uno dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato (PS) en sus dos enlaces internucleotídicos terminales 5' y 3', a menos que se indique de otro modo.

35 En el conjugado 4, las unidades de serinol-GalNAc se unen mediante un enlace fosfodiéster. En el conjugado 5, las unidades de serinol-GalNAc se conjugan a través de PS, mientras que todos los enlaces entre nucleótidos en la segunda cadena son fosfodiésteres. En el conjugado 6, la segunda cadena no contiene PS. En el conjugado 7, dos unidades de serinol-GalNAc están unidas a cada extremo de la segunda cadena y entre sí a través de enlaces PS en los extremos respectivos. En el conjugado 8, se aplicaron un modificador de amino C6 en 5' y un modificador de amino C7 en el extremo 3' de la segunda cadena para la unión del ligando. En el conjugado 9 se utilizaron modificadores Gly-C3-amino, en el conjugado 10 modificadores piperidil-amino, en el conjugado 11 modificadores de amino C3 y en el conjugado 2 unidades serinol-GalNAc como enlazadores para la conjugación a ambos extremos de la segunda cadena. En el conjugado 2, tanto los internucleótidos terminales como los enlaces nucleótido-serinol son PS. En el conjugado 12, se aplicaron un modificador de amino C6 en el extremo 5' y un modificador de amino GlyC3 en el extremo 3' de la segunda cadena para la unión del ligando. "st" indica una muestra sin tratamiento a la que se normalizaron las otras muestras. "Luc" indica un ARNip dirigido a luciferasa (Conjugado de referencia 3), que se utilizó como control no dirigido y que no reduce los niveles de ARNm diana.

45 Los datos muestran que en el contexto de un resto enlazador procedente de serinol que se proporciona en los extremos 5' y 3' de la cadena de sentido, el número de enlaces de fosforotioato (PS) entre el nucleótido terminal y el enlazador, y/o entre los tres nucleótidos terminales en la cadena de sentido, se puede variar manteniendo la estabilidad en suero.

Ejemplo 13

55 Los hepatocitos primarios humanos (Lote Hu1823) y de macaco (Lote CY367), y el medio se obtuvieron de Life Technologies. Tal como lo describe el fabricante, los hepatocitos primarios se descongelaron y se sembraron en placas que consistían en medio E de Williams (Life Technologies), complementado con suero fetal bovino al 5 %, dexametasona 1 μ M en DMSO (concentración final de DMSO = 0,01 %) y Thawing/Plating Cocktail-A al 3,6 % v/v (Thermo Fisher Scientific, CM3000).

60 Se sembraron hepatocitos primarios humanos en placas de 96 pocillos recubiertas con colágeno I (Life Technologies) a una densidad de 30.000 células por pocillo. Se sembraron hepatocitos de macaco a una densidad de 45.000 células por pocillo. El conjugado 21 y un ARNip conjugado con GalNAc de control se diluyeron en serie 5 veces en un intervalo de concentración de 0,006 a 100 nM y se añadieron inmediatamente después de sembrar en medios de sembrado. A continuación, las placas se incubaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. Posteriormente, las células se lisaron y el ARN se aisló utilizando el método descrito a continuación.

Secuencias del conjugado 21

Cadena antisentido - Conjugado 21 (SEQ ID NO: 165)

5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3'

5

Cadena de sentido - STS16001BL20 (SEQ ID NO: 164)

5' [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3'

10 El ARN total se extrajo con el kit de 96 pocillos InviTrap HTS (Stratec Molecular GmbH, Berlín, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante con los siguientes cambios en el protocolo: Después de la última etapa de lavado, las placas se centrifugaron a 6.000 rpm durante veinte minutos. Posteriormente, la placa de unión a ARN se colocó encima de una placa de elución y el ARN se eluyó mediante dos rondas de adición de 30 µl de tampón de elución e incubación durante dos minutos a temperatura ambiente, seguido de un minuto de centrifugación a 1.000 rpm. Se realizó una etapa de elución final mediante centrifugación a 1700g (4000 rpm) durante 3 minutos. El ARN se almacenó a -80 °C.

20 Se utilizaron diez µl de solución de ARN para el análisis de la expresión génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) realizada con conjuntos/secuencias de amplicón para *LPA*, *ACTB* (Eurogentec Deutschland GmbH, Colonia, Alemania), *APOB* y *PLG* (BioTez GmbH, Berlín, Alemania).

25 Las reacciones de RT-qPCR se llevaron a cabo con un ABI StepOne Plus (Applied Biosystems, parte de Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.) usando protocolos convencionales para RT-PCR (48 °C 30 min, 95 °C 10 min, 40 ciclos a 95 °C 15 s seguido de 60 °C 1 min).

En hepatocitos primarios, los análisis de *LPA* y *PLG* se realizaron en ensayos simples (cebadores: 300 nM, sonda: 100 nM). Se ejecutaron *APOB* (200 nM) y *ACTB* (300 nM) en un ensayo múltiple mediante la adición de 100 nM de cada sonda a la mezcla convencional.

30 Los datos se calcularon mediante el uso del método CT comparativo, también conocido como método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001 y Schmittgen y Livak, 2008). Aquí la cantidad de ARNm de *APOB*, *LPA* o *PLG* normalizado a la referencia endógena de *ACTB* en relación con un calibrador (control sin tratamiento) viene dada por la fórmula

$$\text{Factor de cambio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

35

A menos que se indique de otro modo, todos los valores presentados en el ejemplo se refieren a la media \pm DT. Los valores de CI_{50} se calcularon utilizando una curva de respuesta a la dosis de 4 parámetros sigmoidales en GraphPad Prism 7.

40 En la figura 19 se muestra la atenuación del ARNm de *LPA* por el conjugado 21 a través de la captación mediada por receptor en hepatocitos primarios humanos 24 horas después del tratamiento con ARNip ($CI_{50} = 3,6$ nM). Los niveles de expresión del ARNm de *LPA* se normalizaron a *ACTB* y en relación con las células tratadas con un control de ARNip sin direccionamiento medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media \pm DT de un solo experimento. En la figura 20 se muestra la atenuación del ARNm de *LPA* por el conjugado 21 a través de la captación mediada por receptor en hepatocitos primarios de macaco 24 horas después del tratamiento con ARNip ($CI_{50} = 0,7$ nM). Los niveles de expresión del ARNm de *LPA* se normalizaron a *ACTB* y en relación con las células tratadas con un control de ARNip sin direccionamiento medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media \pm DT de un solo experimento.

50 En la figura 21 se muestra la atenuación del ARNm de *APOB* por el conjugado 21 a través de la captación mediada por receptor en hepatocitos primarios humanos 24 horas después del tratamiento con ARNip. Los niveles de expresión del ARNm de *APOB* se normalizaron a *ACTB* y en relación con las células tratadas con un control de ARNip sin direccionamiento medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media \pm DT de un solo experimento.

55 En la figura 22 se muestra la atenuación del ARNm de *PLG* por el conjugado 21 a través de la captación mediada por receptor en hepatocitos primarios humanos 24 horas después del tratamiento con ARNip. Los niveles de expresión del ARNm de *PLG* se normalizaron a *ACTB* y en relación con las células tratadas con un control de ARNip sin direccionamiento medido mediante RT-qPCR. Los datos se presentan como la media \pm DT de un solo experimento.

60 El conjugado 21 alcanza elevados niveles de inhibición del ARNm de *LPA* sin afectar los niveles de los ARNm de *APOB* y *PLG*.

Ejemplo 14

65 Para probar la eficacia del conjugado 21 *in vivo*, se utilizaron macacos machos para realizar un estudio farmacodinámico. Los animales se agruparon en 4 grupos, 3 animales por grupo. Antes de la dosificación, se preparó

suero para establecer el nivel de referencia de Lp(a) para cada animal. El día 1, se formuló el conjugado 21 en solución salina al 0,9 % y cada animal recibió una dosis única del conjugado 21 en dosis de 0,1, 0,3, 1,0 y 3,0 mg/kg.

- 5 Se tomaron muestras seriadas durante 29 días y se midieron los niveles de Lp(a) mediante ELISA (Mercodia, n.º de catálogo 10-1106-01, lote: 27736; Uppsala, Suecia). Todos los valores se normalizaron a los valores de referencia para cada animal individual tomados antes de la dosificación y presentados como un porcentaje del nivel inicial (Figura 23). Las dosis de 1,0 y 3,0 mg/kg mostraron una marcada reducción de los niveles de Lp(a) en suero (69,4 y 77,3 % después de 29 días, respectivamente). El efecto dependiente de la dosis da como resultado una DE_{50} de 0,56 mg/kg
- 10 (Figura 24). Estos datos indican que se puede lograr una reducción significativa y sostenida de la Lp(a) en suero mediante una sola dosis del conjugado 21. Basándose en estos datos, se esperaría que la dosificación fuera poco frecuente, no más a menudo que una vez cada dos meses.

Tabla sumario de secuencias

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5'-3')	Secuencia homóloga sin modificar (5'-3')
1	Primera cadena de LPA-1014	UCGUAAUACAACAAUAAGGGGC	UCGUAAUACAACAAUAAGGGGC
2	Segunda cadena de LPA-1014	GCCCCUUAUUUGUUUAACGA	GCCCCUUAUUUGUUUAACGA
3	Primera cadena de LPA-1024	GAUAACUCUGUCCAUAUACC	GAUAACUCUGUCCAUAUACC
4	Segunda cadena de LPA-1024	GGUAAUGGACAGAGUUUJUC	GGUAAUGGACAGAGUUUJUC
5	Primera cadena de LPA-1038	AUAACUCUGUCCAUAUACCA	AUAACUCUGUCCAUAUACCA
6	Segunda cadena de LPA-1038	UGGUAAUGGACAGAGUUUJAU	UGGUAAUGGACAGAGUUUJAU
7	Primera cadena de LPA-1040	UAACUCUGUCCAUAUACCGU	UAACUCUGUCCAUAUACCGU
8	Segunda cadena de LPA-1040	ACGGUAAUGGACAGAGUUUA	ACGGUAAUGGACAGAGUUUA
9	Primera cadena de LPA-1041	AUAACUCUGUCCAUAUACCG	AUAACUCUGUCCAUAUACCG
10	Segunda cadena de LPA-1041	CGGUAAUGGACAGAGUUUJAU	CGGUAAUGGACAGAGUUUJAU
11	Primera cadena de LPA-1055	AGAAUGUGCCUCGAAUACU	AGAAUGUGCCUCGAAUACU
12	Segunda cadena de LPA-1055	AGUUUUCGAGGCACAUUCU	AGUUUUCGAGGCACAUUCU
13	Primera cadena de LPA-1057	AUAACUCUGUCCAUAUACCA	AUAACUCUGUCCAUAUACCA
14	Segunda cadena de LPA-1057	UGGUGAUGGACAGAGUUUJAU	UGGUGAUGGACAGAGUUUJAU
15	Primera cadena de LPA-1058	AUAACUCUGUCCAUAUACCCU	AUAACUCUGUCCAUAUACCCU
16	Segunda cadena de LPA-1058	AGGUGAUGGACAGAGUUUJAU	AGGUGAUGGACAGAGUUUJAU
17	Primera cadena de LPA-1061	UAACUCUGUCCAUAUACCAU	UAACUCUGUCCAUAUACCAU
18	Segunda cadena de LPA-1061	AUGGUAAUGGACAGAGUUUA	AUGGUAAUGGACAGAGUUUA
19	Primera cadena de LPA-1086	AUGUGCCUUUGAAUACUCUG	AUGUGCCUUUGAAUACUCUG
20	Segunda cadena de LPA-1086	CAGAGUUUAUCAAGGCACAU	CAGAGUUUAUCAAGGCACAU
21	Primera cadena de LPA-1099	AGUUGGUGUGCUUCAGAA	AGUUGGUGUGCUUCAGAA
22	Segunda cadena de LPA-1099	UUCUGAAGCAGCACCAACU	UUCUGAAGCAGCACCAACU
23	Primera cadena de LPA-1102	AAUAAGGGGCGUCCACAGG	AAUAAGGGGCGUCCACAGG
24	Segunda cadena de LPA-1102	CCUGUGGACGCCCUUUAUU	CCUGUGGACGCCCUUUAUU
25	Primera cadena de LPA-1116	UAACUCUGUCCAUAUACCAU	UAACUCUGUCCAUAUACCAU
26	Segunda cadena de LPA-1116	AUGGUGAUGGACAGAGUUUA	AUGGUGAUGGACAGAGUUUA
27	Primera cadena de LPA-1127	AUGAGCCUCGAAUACUCUG	AUGAGCCUCGAAUACUCUG
28	Segunda cadena de LPA-1127	CAGAGUUUAUCGAGGCUCAU	CAGAGUUUAUCGAGGCUCAU
29	Primera cadena de LPA-1128	AAUGAGCCUCGAAUACUCU	AAUGAGCCUCGAAUACUCU

(continuación)

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5'-3')	Secuencia homóloga sin modificar (5'-3')
30	Segunda cadena de LPA-1128	AGAGUUUUCGAGGCUCAUU	AGAGUUUUCGAGGCUCAUU
31	Primera cadena de LPA-1141	AAUGCUUCCAGGACAUUUC	AAUGCUUCCAGGACAUUUC
32	Segunda cadena de LPA-1141	GAAUUGUCCUGGAAAGCAUU	GAAUUGUCCUGGAAAGCAUU
33	Primera cadena de LPA-1151	ACAGUGGUGGAGAAUUGGC	ACAGUGGUGGAGAAUUGGC
34	Segunda cadena de LPA-1151	GCACAUUCCACCACUCUGU	GCACAUUCCACCACUCUGU
35	Primera cadena de LPA-1171	GU AUGUGCCUCGAUAAACUC	GU AUGUGCCUCGAUAAACUC
36	Segunda cadena de LPA-1171	GAGUUUUCGAGGCACAUJAC	GAG U UAU CGAGGCACAUJAC
37	Primera cadena de LPA-1177	UCGAUAAACUCUGUCCAUCA	UCGAUAAACUCUGUCCAUCA
38	Segunda cadena de LPA-1177	UGAUGGACAGAUUJUCGA	UGAUGGACAGAUUJUCGA
39	Primera cadena de LPA-1189	UGUCACUGGACAUUUGUGUC	UGUCACUGGACAUUUGUGUC
40	Segunda cadena de LPA-1189	GACACAAUGUCCAGUGACA	GACACAAUGUCCAGUGACA
41	Primera cadena de LPA-1244	CUGGGAUCCAUJGUGUAAC	CUGGGAUCCAUJGUGUAAC
42	Segunda cadena de LPA-1244	GUUACACCAUGGAUCCCCAG	GUUACACCAUGGAUCCCCAG
43	Primera cadena de LPA-1248	AGAUGACCAAGCUUJGGCAG	AGAUGACCAAGCUUJGGCAG
44	Segunda cadena de LPA-1248	CUGCCAAGCUUJGGUCAUCU	CUGCCAAGCUUJGGUCAUCU
45	LPA: (superior) humano	AAGTGCTCTTGCAGCGTCC	AAGTGCTCTTGCAGCGTCC
46	LPA: (inferior) humano	CCTGGACTGTGGGGCTTT	CCTGGACTGTGGGGCTTT
47	LPA: (sonda) humano	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGGAGC	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGGAGC
48	LPA (superior) de macaco	GTGTCTCTCGCAACGTCCA	GTGTCTCTCGCAACGTCCA
49	LPA (inferior) de macaco	GACCCCGGGGCTTTG	GACCCCGGGGCTTTG
50	LPA (sonda) de macaco	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG
51	APOB (superior) humano	TCATTCTTCCCAAGAGACC	TCATTCTTCCCAAGAGACC
52	APOB (inferior) humano	CACCTCCGTTTTGGTGTAGAG	CACCTCCGTTTTGGTGTAGAG
53	APOB (sonda) humano	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA	CAAGCTGCTCAGTGGAGGCAACACATTA
54	β-actina (superior) humana	GCATGGGTCAGAAGGATTCCCTAT	GCATGGGTCAGAAGGATTCCCTAT
55	β-actina (inferior) humana	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT	TGTAGAAGGTGTGGTGCCAGATT
56	β-actina (sonda) humana	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA	TCGAGCACGGCATCGTCACCAA
57	β-actina (superior) de macaco	AAGGCCAACCCGCGAGAAG	AAGGCCAACCCGCGAGAAG
58	β-actina (inferior) de macaco	AGAGGCGTACAGGGACAGCA	AGAGGCGTACAGGGACAGCA

(continuación)

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5'-3')	Secuencia homóloga sin modificar (5'-3')
59	β -actina (sonda) de macaco	TGAGACCTTCAACACCCCGCATGTAC	TGAGACCTTCAACACCCCGCATGTAC
60	PPIB (superior) humano	AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT	AGATGTAGGCCGGGTGATCTTT
61	PPIB (inferior) humano	GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT	GTAGCCAAATCCTTTCTCTCCTGT
62	PPIB (sonda) humano	TGTTCCAAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC	TGTTCCAAAAACAGTGGATAATTTTGTGGCC
63	LPA: (superior) humano	AAGTGTCTTGGACGTCC	AAGTGTCTTGGACGTCC
64	LPA: (inferior) humano	CCTGGACTGTGGGGCTTT	CCTGGACTGTGGGGCTTT
65	LPA: (sonda) humano	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGGAGC	CTGTTTCTGAACAAGCACCAACGGGAGC
66	LPA (superior) de macaco	GTGTCCTCGAACGTCCA	GTGTCCTCGAACGTCCA
67	LPA (inferior) de macaco	GACCCCGGGGCTTTG	GACCCCGGGGCTTTG
68	LPA (sonda) de macaco	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG	TGGCTGTTTCTGAACAAGCACCAATGG
69	APOB (superior) humano	TCATTCTTCCCAAAGAGACC	TCATTCTTCCCAAAGAGACC
70	APOB (inferior) humano	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG	CACCTCCGTTTTGGTGGTAGAG
71	APOB (sonda) humano	CAAGTGTCTCAGTGGAGGCAACACATTA	CAAGTGTCTCAGTGGAGGCAACACATTA
72	β -actina (superior) humana	GCATGGTTCAGAAGGATTCTTAT	GCATGGTTCAGAAGGATTCTTAT
73	β -actina (inferior) humana	TGTAGAAGGTGTGGTCCAGATT	TGTAGAAGGTGTGGTCCAGATT
74	β -actina (sonda) humana	TCGAGCACGGGATCGTCAACAA	TCGAGCACGGGATCGTCAACAA
75	SEQ ID NO: 1 modificada	5381616272616284847	UCGUAAACAACAAUAGGGGGC
76	SEQ ID NO: 2 modificada	4737351615451616382	GCCCCUUAUUGUUAUACGA
77	SEQ ID NO: 3 modificada	8252635354537251637	GAUAAUCUCUGUCCAUUACC
78	SEQ ID NO: 4 modificada	4816254827282815253	GGUAAUGGACAGAGUUUAUC
79	SEQ ID NO: 5 modificada	6162717181736152736	AUAAUCUCUGUCCAUUACCA
80	SEQ ID NO: 6 modificada	1845261846364645161	UGGUAAUGGACAGAGUUUAU
81	SEQ ID NO: 7 modificada	5263535453725163745	UAACUCUGUCCAUUACCGU
82	SEQ ID NO: 8 modificada	2748162548272828152	ACGGUAAUGGACAGAGUUA
83	SEQ ID NO: 9 modificada	6162717181736152738	AUAAUCUCUGUCCAUUACCG
84	SEQ ID NO: 10 modificada	3845261846364645161	CGGUAAUGGACAGAGUUUAU
85	SEQ ID NO: 11 modificada	6462545473538252635	AGAAUGGCCUCCGAUAAUCU
86	SEQ ID NO: 12 modificada	2815253828472725171	AGUUUAUCGAGGCACAUUCU
87	SEQ ID NO: 13 modificada	6162717181736172736	AUAAUCUCUGUCCAUACCA

(continuación)

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5'-3')	Secuencia homóloga sin modificar (5'-3')
88	SEQ ID NO: 14 modificada	1845461846364645161	UGGUGAUGGACAGAGUUUAU
89	SEQ ID NO: 15 modificada	6162717181736172735	AUAACUCUGUCCAUACCCU
90	SEQ ID NO: 16 modificada	2845461846364645161	AGGUGAUGGACAGAGUUUAU
91	SEQ ID NO: 17 modificada	5263535453725163725	UAACUCUGUCCAUUACCAU
92	SEQ ID NO: 18 modificada	2548162548272828152	AUGGUAAUGGACAGAGUUA
93	SEQ ID NO: 19 modificada	6181837154616271718	AUGUGCCUUGAUAAACUCUG
94	SEQ ID NO: 20 modificada	3646451617264836361	CAGAGUUAUCAAGGCACAU
95	SEQ ID NO: 21 modificada	6451845471835172826	AGUUGGUGUCUUCAGAA
96	SEQ ID NO: 22 modificada	1535462836472736271	UUCUGAAGCAGCACCAACU
97	SEQ ID NO: 23 modificada	6252648483547363648	AAUAAAGGGGCGCCACAGG
98	SEQ ID NO: 24 modificada	3718184728373715251	CCUGUGGCAGCCCCUUUU
99	SEQ ID NO: 25 modificada	5263535453725363725	UAACUCUGUCCAUACCAU
100	SEQ ID NO: 26 modificada	2548182548272828152	AUGGUGAUGGACAGAGUUA
101	SEQ ID NO: 27 modificada	6182837174616271718	AUGAGCCUCGAUAAACUCUG
102	SEQ ID NO: 28 modificada	3646451617464835361	CAGAGUUAUCGAGGCUCAU
103	SEQ ID NO: 29 modificada	6254647353825263535	AAUGAGCCUCGAUAAACUCU
104	SEQ ID NO: 30 modificada	2828152538284717251	AGAGUUAUCGAGGCUCAUU
105	SEQ ID NO: 31 modificada	6254715372846361517	AAUGCUUCCAGGACAUUUC
106	SEQ ID NO: 32 modificada	4626181735482647251	GAAUUGUCCUGGAAGCAUU
107	SEQ ID NO: 33 modificada	6364548184646254547	ACAGUGGUGGAGAAUGUGC
108	SEQ ID NO: 34 modificada	4727251717363727181	GCACAUUCUCCACCACUGU
109	SEQ ID NO: 35 modificada	8161818371746162717	GU AUGUGCCUCGAUAAACUC
110	SEQ ID NO: 36 modificada	4645161746483636163	GAGUUAUCGAGGCACAUAC
111	SEQ ID NO: 37 modificada	5382526353545372536	UCGAUAAUCUGUCCAUCA
112	SEQ ID NO: 38 modificada	1825482728281525382	UGAUGGACAGAGUUUAUCGA
113	SEQ ID NO: 39 modificada	5453635482725181817	UGUCACUGGACAUUGUGUC
114	SEQ ID NO: 40 modificada	4636362545372818272	GACACAAUGUCCAGUGACA
115	SEQ ID NO: 41 modificada	7184825372548181627	CUGGGAUCCAUUGGUAAAC
116	SEQ ID NO: 42 modificada	4516363725482537364	GUUACACCAUGGAUCCCCAG

(continuación)

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5'-3')	Secuencia homóloga sin modificar (5'-3')
117	SEQ ID NO: 43 modificada	6461827362835184728	AGAUGACCAAGCUUUGGCAG
118	SEQ ID NO: 44 modificada	3547362835184536171	CUGCCAAGCUUUGGUAUCU
119	Primera cadena de GalINAc-LPA-1038-L1	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA	AUAACUCUGUCCAUAUACCA
120	Segunda cadena de GalINAc-LPA-1038-L1	[ST23 (ps)]3 trebler largo (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	UGGUAUUGGACAGAGUUUU
121	Primera cadena de Gal NAc-LPA-1038-L6	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeA	AUAACUCUGUCCAUAUACCA
122	Segunda cadena de GalINAc-LPA-1038-L6	[ST23 (ps)]3 ST43 (ps)FU-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	UGGUAUUGGACAGAGUUUU
123	Primera cadena de GalINAc-LPA-1041-L1	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG	AUAACUCUGUCCAUAUACCG
124	Segunda cadena de GalINAc-LPA-1041-L1	[ST23 (ps)]3 trebler largo (ps)FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	CGGUAUUGGACAGAGUUUU
125	Primera cadena de Gal NAc-LPA-1041-L6	OMeA-(ps)-FU-(ps)-OMeA-FA-OMeC-FU-OMeC-FU-OMeG-FU-OMeC-FC-OMeA-FU-OMeU-FA-OMeC-(ps)-FC-(ps)-OMeG	AUAACUCUGUCCAUAUACCG
126	Segunda cadena de GalINAc-LPA-1041-L6	[ST23 (ps)]3 ST43 (ps)FC-OMeG-FG-OMeU-FA-OMeA-FU-OMeG-FG-OMeA-FC-OMeA-FG-OMeA-FG-OMeU-FU-(ps)-OMeA-(ps)-FU	CGGUAUUGGACAGAGUUUU
127	STS16001AL33	mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU (ps) Ser(GN)	UUUAUAGAGCAAGAACACACUGUU
128	STS16001BL20	Ser(GN) (ps) fA mA fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUUUUGCUCUAUAA
129	STS16001A	mU (ps) fU (ps) mA fU mA fG mA fG mC fA mA fG mA fA mC fA mC fU mG (ps) fU (ps) mU	UUUAUAGAGCAAGAACACACUGUU
130	STS16001BV1L42	Ser(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) Ser(GN)	AACAGUGUUUUUGCUCUAUAA
131	STS16001V1B	fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUUUUGCUCUAUAA
132	STS18001A	mU (ps) fC (ps) mG fA mA fG mU fA mU fU mC fC mG fC mG fU mA (ps) fC (ps) mG	UCGAAGUAUUCCCGGUACG
133	STS18001BL4	[(ST23) (ps)]3 C4XLT (ps) fC mG fU mA fC mG fC mG fG mA fA mU fA mC fU mU fC (ps) mG (ps) fA	CGUACGCGGAAUAUUCUGCA

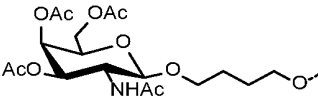
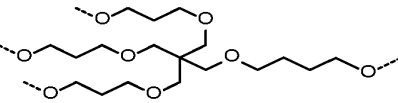
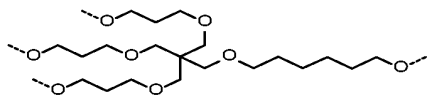
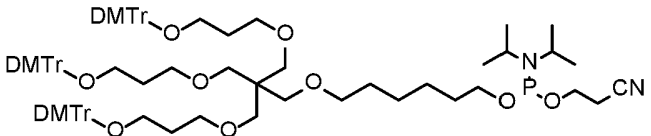
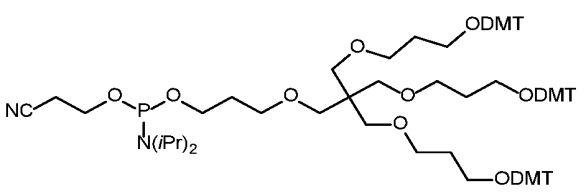
(continuación)

SEQ ID NO	Nombre	Secuencia (5'-3')	Secuencia homóloga sin modificar (5'-3')
150	STS16001V1BL87	C6Am(GN) (ps) fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mC fU mU fG mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA (ps) GlyC3Am(GN)	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
151	Cadena de antisentido del conjugado 15	mU (ps) fC (ps) mU fU mC fU mU fA mA fA mA fA mC fU mG fA mG fU mU (ps) fU (ps) mC	UCUUUUAAAACUCUGAGUUUC
152	Cadena de sentido del conjugado 15	Ser(GN) (ps) fG (ps) mA (ps) fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA (ps) Ser(GN)	GAAACUCAGUUUUAAGAAAGA
153	Cadena de antisentido del conjugado 16	mA (ps) fU (ps) mG fU mA fG mC fC mG fA mG fG mA fU mC fU mU (ps) fC (ps) mil	AUGUAGCCGAGGAUCUUCU
154	Cadena de antisentido del conjugado 16	Ser(GN) (ps) fA (ps) mG (ps) fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU (ps) Ser(GN)	AGAAGAUCUUCGGCUACAU
155	Cadena de antisentido del conjugado 18	mA (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA	AACCAGAAAGCAGGUGA
156	Cadena de sentido del conjugado 18	Ser(GN) (ps) fU (ps) mC (ps) fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fU (ps) Ser(GN)	UCACCUUGUUUCUUGGUU
157	STS16001BV1	fA (ps) mA (ps) fC mA fG mU fG mU fU mC fU mU fG mC fU mC fU mA fU (ps) mA (ps) fA	AACAGUGUUCUUGCUCUAUAA
158	Cadena de sentido del conjugado de referencia 6	[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fG mA fA mA fC mU fC mA fG mU fU mU fA mA fG mA fA (ps) mG (ps) fA	GAAACUCAGUUUUAAGAAAGA
159	Cadena de sentido del conjugado de referencia 7	[ST23 (ps)]3 ltrb (ps) fA mG fA mA fG mA fU mC fC mU fC mG fG mC fU mA fC (ps) mA (ps) fU	AGAAGAUCUUCGGCUACAU
160	Cadena de antisentido del conjugado de referencia 8	mU (ps) fA (ps) mC fC mA fG mA fA mA fG mA fA mG fA mA fG mC fA mG fG mU (ps) fG (ps) mA	UACCAGAAAGCAGGUGA
161	Cadena de sentido del conjugado de referencia 8	[ST23 (ps)]3 ST41 (ps) fU mC fA mC fC mU fG mC fU mU fC mU fU mC fU mG fG (ps) mU (ps) fA	UCACCUUGUUUCUUGGUUA
162	Cadena de sentido del conjugado de referencia 9	[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) fC mG fG mU fA mA fU mG fG mA fC mA fG mA fG mU fU (ps) mA (ps) fU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
163	Cadena de sentido del conjugado 21 sin ligando	mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
164	Cadena de sentido del conjugado 21	[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU	CGGUAAUGGACAGAGUUAU
165	Cadena de antisentido del conjugado 21	mA (ps) fU (ps) mA fA mA fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG	AUACUCUGUCCAUUACCG

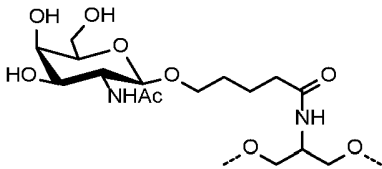
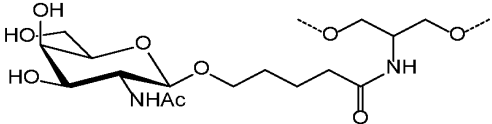
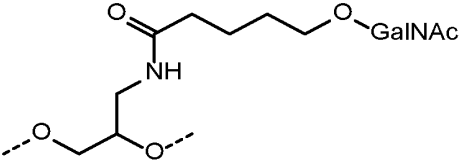
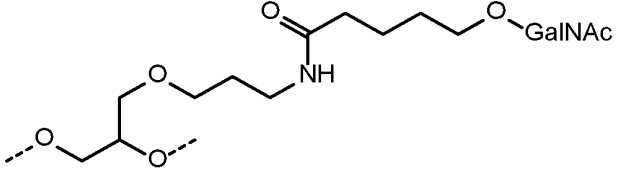
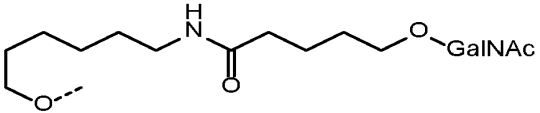
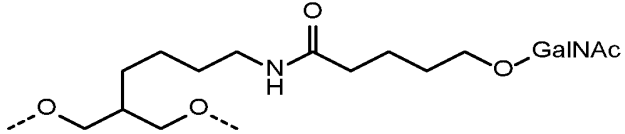
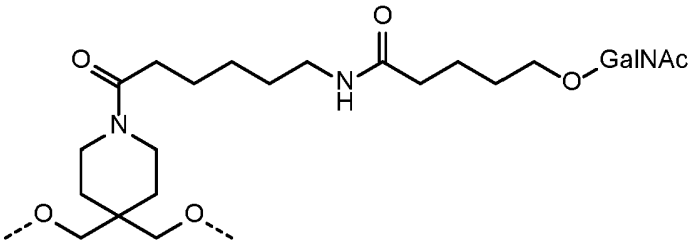
Una sola secuencia puede tener más de un nombre. En esos casos, uno de esos nombres se da en la tabla sumario de secuencias.

5 Cuando se muestran enlazadores específicos o enlaces modificados dentro de una secuencia de ARN, tales como (ps) y [ST23 (ps)]₃ ST41 (ps), etc., éstos son partes opcionales de la secuencia, pero son una realización preferida de esa secuencia.

Pueden utilizarse las siguientes abreviaturas, particularmente en las secuencias enumeradas:

Abreviatura	Significado
1	2'F-dU
2	2'F-dA
3	2'F-dC
4	2'F-dG
5	2'OMe-rU
6	2'OMe-rA
7	2'OMe-rC
8	2'OMe-rG
mA, mU, mC, mG, OMeA, OMeU, OMeC, OMeG	ARN 2'-OMe
2'-OMe	modificación 2'-O-metilo
fA, fU, fC, fG	2' desoxi-2'-F ARN nucleótidos
2'-F, 2'-fluoro, 2' fluoro	modificación 2'-fluoro
(ps)	fosforotioato
(vp)	Vinil-(E)-fosfonato
ivA, ivC, ivU, ivG	ARN invertido (3'-3')
FAM	6-carboxifluoresceína
BHQ	Black Hole Quencher 1
ST23	
ST41/C4XLT	
ST43 (o C6XLT)	
ST43-phos/C6XLT-phos	
Trebler largo/ltrb/ STKS (fosforamidita)	

(continuación)

Abreviatura	Significado
Ser(GN)	
Ser(GN) (fosforamidita)	
C3Am(GN)	
GlyC3Am(GN)	
C6Am(GN)	
C7Am(GN)	
PipAm(GN)	

(continuación)

Abreviatura	Significado
<p>[ST23 (ps)]3 C4XLT (ps) = [ST23 (ps)]3 ST41 (ps) = L4</p>	
<p>[ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) = [ST23 (ps)]3 ST43 (ps) = L6</p>	

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Silence Therapeutics GmbH
- <120> Ácidos nucleicos para inhibir la expresión de LPA en una célula
- <130> S121PCT
- 10 <150> PCT/EP2018/081106

<151> 13/11/2018
 <150> EP19174466.3
 <151> 14/05/2019
 5 <160> 165
 <170> PatentIn versión 3.5
 10 <210> 1
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> ARNip
 <400> 1
 20 **ucguauaaca auaaggggc** 19
 <210> 2
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> ARNip
 <400> 2
 30 **gccccuauu guuauacga** 19
 <210> 3
 <211> 19
 <212> ARN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 40 <400> 3
gauaacucug ucgauuacc 19
 <210> 4
 <211> 19
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ARNip
 50 <400> 4
gguaauggac agaguuauc 19
 <210> 5
 <211> 19
 55 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> ARNip
 <400> 5
auaacucugu ccgauuacca 19
 65 <210> 6

	<211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> ARNip	
	<400> 6 ugguaaugga cagaguau	19
10	<210> 7 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip	
	<400> 7 uaacucuguc cauuaccgu	19
20	<210> 8 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip	
	<400> 8 acgguaaugg acagaguua	19
30	<210> 9 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ARNip	
	<400> 9 auaacucugu ccauuaccg	19
40	<210> 10 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> ARNip	
	<400> 10 cgguaaugga cagaguau	19
50	<210> 11 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> ARNip	
	<400> 11 agaaugugcc ucgaaacu	19
60		

ES 2 932 295 T3

5	<p><210> 12 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> ARNip</p>	
10	<p><400> 12 aguuaucgag gcacauuccu</p>	19
15	<p><210> 13 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> ARNip</p>	
20	<p><400> 13 auaacucugu ccaucacca</p>	19
25	<p><210> 14 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> ARNip</p>	
30	<p><400> 14 uggugaugga cagaguuau</p>	19
35	<p><210> 15 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> ARNip</p>	
40	<p><400> 15 auaacucugu ccaucacccu</p>	19
45	<p><210> 16 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> ARNip</p>	
50	<p><400> 16 aggugaugga cagaguuau</p>	19
55	<p><210> 17 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial</p> <p><220> <223> ARNip</p>	
60	<p><400> 17</p>	
65		

	uaacucuguc cauuaccau	19
	<210> 18	
	<211> 19	
5	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
10	<400> 18	
	augguaaugg acagaguua	19
	<210> 19	
15	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> ARNip	
	<400> 19	
	augugccuug auaacucug	19
25	<210> 20	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 20	
	cagaguuauc aaggcacau	19
35	<210> 21	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 21	
45	aguuggugcu gcuucagaa	19
	<210> 22	
	<211> 19	
	<212> ARN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
55	<400> 22	
	uucugaagca gcaccaacu	19
	<210> 23	
	<211> 19	
60	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	

	<400> 23 aauaaggggc ugccacagg	19
5	<210> 24 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip	
	<400> 24 ccuguggcag ccccuauu	19
15	<210> 25 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip	
	<400> 25 uaacucuguc caucaccau	19
25	<210> 26 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip	
	<400> 26 auggugaugg acagaguua	19
35	<210> 27 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip	
	<400> 27 augagccucg auaacucug	19
45	<210> 28 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip	
	<400> 28 cagaguuauc gaggcucau	19
55	<210> 29 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	
65	<220>	

ES 2 932 295 T3

	<223> ARNip	
	<400> 29	
5	aaugagccuc gauaacucu	19
	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 30	
15	agaguuaucg aggcucauu	19
	<210> 31	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
25	<400> 31	
	aaugcuucca ggacauuuc	19
	<210> 32	
	<211> 19	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip	
35	<400> 32	
	gaaauguccu ggaagcauu	19
	<210> 33	
40	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> ARNip	
	<400> 33	
	acaguggugg agaaugugc	19
50	<210> 34	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> ARNip	
	<400> 34	
60	gcacauucuc caccacugu	19
	<210> 35	
	<211> 19	
	<212> ARN	
65	<213> Secuencia artificial	

	<220> <223> ARNip	
5	<400> 35 guaugugccu cgauaacuc	19
10	<210> 36 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip	
	<400> 36 gaguuaucga ggcacauac	19
20	<210> 37 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip	
	<400> 37 ucgauaacuc uguccauca	19
30	<210> 38 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ARNip	
	<400> 38 ugauggacag aguuaucga	19
40	<210> 39 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> ARNip	
50	<400> 39 ugucacugga cauuguguc	19
55	<210> 40 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip	
60	<400> 40 gacacaaugu ccagugaca	19
65	<210> 41 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> ARNip	
5	<400> 41 cugggaucca ugguguaac	19
10	<210> 42 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip <400> 42 guuacaccau ggaucaccag	19
20	<210> 43 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip <400> 43 agaugaccaa gcuuggcag	19
30	<210> 44 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ARNip <400> 44 cugccaagcu uggucaucu	19
40	<210> 45 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador <400> 45 aagtgtcctt gcgacgtcc	19
50	<210> 46 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador <400> 46 cctggactgt ggggcttt	18
60	<210> 47 <211> 27	

ES 2 932 295 T3

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Sonda	
	<400> 47 ctgtttctga acaagcacca acggagc	27
10	<210> 48 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador	
	<400> 48 gtgtcctcgc aacgtcca	18
20	<210> 49 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador	
	<400> 49 gaccccgggg ctttg	15
30	<210> 50 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Sonda	
	<400> 50 tggtgtttc tgaacaagca ccaatgg	27
40	<210> 51 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Cebador	
	<400> 51 tcattccttc cccaaagaga cc	22
50	<210> 52 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador	
	<400> 52 cacctccggt ttggtggtag ag	22
60		

ES 2 932 295 T3

5	<210> 53 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sonda	
10	<400> 53 caagctgctc agtggaggca acacatta	28
15	<210> 54 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
20	<400> 54 gcatgggtca gaaggattcc tat	23
25	<210> 55 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
30	<400> 55 tgtagaaggt gtggtgccag att	23
35	<210> 56 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Sonda	
40	<400> 56 tcgagcacgg catcgtcacc aa	22
45	<210> 57 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
50	<400> 57 aaggccaacc gcgagaag	18
55	<210> 58 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	
60	<210> 59 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220> <223> Cebador	

	<400> 58 agaggcgtac agggacagca	20
5	<210> 59 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Sonda	
	<400> 59 tgagaccttc aacaccccag ccatgtac	28
15	<210> 60 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador	
	<400> 60 agatgtaggc cgggtgatct tt	22
25	<210> 61 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Cebador	
	<400> 61 gtagccaaat cctttctctc ctgt	24
35	<210> 62 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
45	<223> Sonda	
	<400> 62 tgttccaaaa acagtggata attttgtggc c	31
50	<210> 63 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> cebador	
	<400> 63 aagtgtcctt gcgacgtcc	19
60	<210> 64 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
65		

	<220>		
	<223> cebador		
	<400> 64		
5	cctggactgt ggggcttt		18
	<210> 65		
	<211> 27		
10	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sonda		
	<400> 65		
15	ctgtttctga acaagcacca acggagc		27
	<210> 66		
	<211> 18		
20	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
25	<400> 66		
	gtgtcctcgc aacgtcca		18
	<210> 67		
30	<211> 15		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
35	<223> cebador		
	<400> 67		
40	gacccccgggg ctttg		15
	<210> 68		
	<211> 27		
	<212> ADN		
45	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> sonda		
	<400> 68		
50	tggctgtttc tgaacaagca ccaatgg		27
	<210> 69		
	<211> 22		
55	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> cebador		
60	<400> 69		
	tcatttccttc cccaaagaga cc		22
	<210> 70		
65	<211> 22		
	<212> ADN		

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 70	
	cacctccggtt ttggtggtag ag	22
10	<210> 71	
	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> sonda	
	<400> 71	
	caagctgctc agtggaggca acacatta	28
20	<210> 72	
	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 72	
30	gcatgggtca gaaggattcc tat	23
	<210> 73	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 73	
40	tgtagaaggt gtggtgccag att	23
	<210> 74	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda	
50	<400> 74	
	tcgagcacgg catcgtcacc aa	22
	<210> 75	
55	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 75	
	ucguauaaca auaaggggc	19

ES 2 932 295 T3

<210> 76
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción

<400> 76

10 **gccccuauuu guuauacga** **19**

<210> 77
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15

<220>
<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción

<400> 77

20 **gauaacucug uccauuacc** **19**

<210> 78
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción

<400> 78

30 **gguaauggac agaguuauc** **19**

<210> 79
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción

<400> 79

40 **auaacucugu ccauuacca** **19**

<210> 80
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción

<400> 80

50 **ugguaaugga cagaguau** **19**

<210> 81
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

55

<220>
<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción

<400> 81

60

	uaacucuguc cauuaccgu	19
5	<210> 82 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 82 acgguaaugg acagaguua	19
15	<210> 83 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 83 auaacucugu ccauuaccg	19
25	<210> 84 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 84 cgguaaugga cagaguau	19
35	<210> 85 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 85 agaaugugcc ucgauaacu	19
45	<210> 86 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 86 aguuaucgag gcacauucu	19
55	<210> 87 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220>	

ES 2 932 295 T3

	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 87	
5	auaacucugu ccaucacca	19
	<210> 88	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 88	
15	uggugaugga cagaguau	19
	<210> 89	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
25	<400> 89	
	auaacucugu ccaucaccu	19
	<210> 90	
	<211> 19	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
35	<400> 90	
	aggugaugga cagaguau	19
	<210> 91	
40	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 91	
	uaacucuguc cauuaccu	19
50	<210> 92	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 92	
60	augguaaugg acagagua	19
	<210> 93	
	<211> 19	

ES 2 932 295 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 93	
	augugccuug auaacucug	19
10	<210> 94 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 94	
	cagaguuauc aaggcacau	19
20	<210> 95 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 95	
30	aguuggugcu gcuucagaa	19
35	<210> 96 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 96	
	uucugaagca gcaccaacu	19
45	<210> 97 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 97	
	aauaaggggc ugccacagg	19
55	<210> 98 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 98	
	ccuguggcag ccccuauu	19

ES 2 932 295 T3

5	<210> 99 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
10	<400> 99 uaacucuguc caucaccau	19
15	<210> 100 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
20	<400> 100 auggugaugg acagaguua	19
25	<210> 101 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
30	<400> 101 augagccucg auaacucug	19
35	<210> 102 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
40	<400> 102 cagaguuauc gaggcucau	19
45	<210> 103 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
50	<400> 103 aaugagccuc gauaacucu	19
55	<210> 104 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	

ES 2 932 295 T3

	<400> 104	
	agaguuaucg aggcucauu	19
5	<210> 105 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 105	
	aaugcuucca ggacauuuc	19
15	<210> 106 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 106	
25	gaaauguccu ggaagcauu	19
30	<210> 107 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
35	<400> 107	
	acaguggugg agaaugugc	19
40	<210> 108 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
45	<400> 108	
	gcacauucuc caccacugu	19
50	<210> 109 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 109	
	guaugugccu cgauaacuc	19
60	<210> 110 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

ES 2 932 295 T3

	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 110	
5	gaguuaucga ggcacauac	19
	<210> 111	
	<211> 19	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
15	<400> 111	
	ucgauaacuc uguccauca	19
	<210> 112	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
25	<400> 112	
	ugauggacag aguuaucga	19
	<210> 113	
30	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 113	
	ugucacugga cauuguguc	19
40	<210> 114	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 114	
50	gacacaaugu ccagugaca	19
	<210> 115	
	<211> 19	
	<212> ARN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 115	
60	cugggaucca ugguguaac	19
	<210> 116	
	<211> 19	

ES 2 932 295 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 116	
	guuacaccau ggaucgccag	19
10	<210> 117	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 117	
	agaugaccaa gcuuggcag	19
20	<210> 118	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 118	
30	cugccaagcu uggucaucu	19
	<210> 119	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
40	<400> 119	
	auaacucugu ccauuacca	19
	<210> 120	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
50	<400> 120	
	ugguaaugga cagaguauu	19
	<210> 121	
55	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 121	

	auaacucugu ccauuacca	19
5	<210> 122 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 122 ugguaaugga cagaguau	19
15	<210> 123 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 123 auaacucugu ccauuaccg	19
25	<210> 124 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 124 cgguaaugga cagaguau	19
35	<210> 125 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 125 auaacucugu ccauuaccg	19
45	<210> 126 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 126 cgguaaugga cagaguau	19
55	<210> 127 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	

	<400> 127	
	uuauagagca agaacacugu u	21
5	<210> 128 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 128	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
15	<210> 129 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 129	
25	uuauagagca agaacacugu u	21
	<210> 130 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
35	<400> 130	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
	<210> 131 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
45	<400> 131	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
	<210> 132 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
55	<400> 132	
	ucgaaguauu cgcguacg	19
60	<210> 133 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

ES 2 932 295 T3

	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
5	<400> 133	
	cguacgcgga auacuucga	19
	<210> 134	
10	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 134	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
	<210> 135	
20	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 135	
	auaacucugu ccuuaccg	19
30	<210> 136	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 136	
40	cgguaaugga cagaguau	19
	<210> 137	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
50	<400> 137	
	cgguaaugga cagaguau	19
	<210> 138	
55	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 138	
	cuuacucucg cccaagcga	19
	<210> 139	

ES 2 932 295 T3

	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 139	
	ucgcuugggc gagaguaag	19
10	<210> 140	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> sonda - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 140	
20	tggtgtttc tgaacaagca ccaatgg	27
	<210> 141	
	<211> 22	
	<212> ADN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> sonda - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
30	<400> 141	
	tcgagcacgg catcgtcacc aa	22
	<210> 142	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
40	<400> 142	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
	<210> 143	
45	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 143	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
55	<210> 144	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 144	

	aacaguguuc uugcucuaua a	21
5	<210> 145 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 145 aacaguguuc uugcucuaua a	21
15	<210> 146 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 146 aacaguguuc uugcucuaua a	21
25	<210> 147 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 147 aacaguguuc uugcucuaua a	21
35	<210> 148 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 148 aacaguguuc uugcucuaua a	21
45	<210> 149 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
55	<400> 149 aacaguguuc uugcucuaua a	21
60	<210> 150 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	

ES 2 932 295 T3

	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 150	
5	aacaguguuc uugcucuaua a	21
	<210> 151	
	<211> 19	
	<212> ARN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 151	
15	ucuucuuaaa cugaguuc	19
	<210> 152	
	<211> 19	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
25	<400> 152	
	gaaacucagu uuaagaaga	19
	<210> 153	
	<211> 19	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
35	<400> 153	
	auguagccga ggaucuucu	19
	<210> 154	
40	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 154	
	agaagauccu cggcuacau	19
50	<210> 155	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
55	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 155	
60	aaccagaaga agcagguga	19
	<210> 156	
	<211> 19	

ES 2 932 295 T3

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 156	
	ucaccugcuu cuucugguu	19
10	<210> 157	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 157	
	aacaguguuc uugcucuaua a	21
20	<210> 158	
	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 158	
30	gaaacucagu uuaagaaga	19
	<210> 159	
	<211> 19	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
40	<400> 159	
	agaagauccu cggcuacau	19
	<210> 160	
	<211> 19	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
50	<400> 160	
	uaccagaaga agcagguga	19
	<210> 161	
55	<211> 19	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción	
	<400> 161	

	ucaccugcuu cuucuggua	19
5	<210> 162 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción <400> 162	
	cgguaaugga cagaguau	19
15	<210> 163 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción <400> 163	
	cgguaaugga cagaguau	19
25	<210> 164 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción <400> 164	
	cgguaaugga cagaguau	19
35	<210> 165 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip - base_modificada, modificado según la tabla sumario de secuencias al final de la descripción <400> 165	
45	auaacucugu ccauuaccg	19

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico para inhibir la expresión de *LPA* en una célula, que comprende al menos una región doble que comprende al menos una parte de una primera cadena y al menos una parte de una segunda cadena que es al menos parcialmente complementaria a la primera cadena, en donde dicha primera cadena es al menos parcialmente complementaria a al menos una parte de ARN transcrito a partir del gen *LPA*, en donde dicha primera cadena comprende una secuencia de nucleótidos de

5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3' (SEQ ID NO: 165), y en donde dicha segunda cadena comprende un secuencia de nucleótidos de

5' mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 163);
en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro;
mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2'-O-metilo; y
(ps) indica un enlace de fosforotioato.

2. El ácido nucleico de las reivindicación 1, en donde la primera cadena consiste en una secuencia de nucleótidos de 5' mA (ps) fU (ps) mA fA mC fU mC fU mG fU mC fC mA fU mU fA mC (ps) fC (ps) mG 3' (SEQ ID NO: 165);

en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro;
mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2'-O-metilo; y
(ps) indica un enlace de fosforotioato.

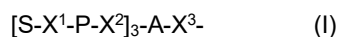
3. El ácido nucleico de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en donde la segunda cadena consiste en una secuencia de nucleótidos de 5' mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 163);

en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro;
mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2'-O-metilo; y
(ps) indica un enlace de fosforotioato.

4. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ácido nucleico está conjugado con un ligando.

5. El ácido nucleico de la reivindicación 4, en donde el ligando comprende (i) uno o más restos de N-acetil galactosamina (GalNAc) o derivados del mismo y (ii) un enlazador, en donde el enlazador conjuga el al menos un resto de GalNAc o derivado del mismo con el ácido nucleico.

6. El ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde el ácido nucleico está conjugado con un ligando que comprende un compuesto de fórmula (I):



en la que:

S representa un sacárido, preferentemente en donde el sacárido es N-acetil galactosamina;

X¹ representa alquileo C₃-C₆ o (-CH₂-CH₂-O)_m(-CH₂)₂- en donde m es 1, 2 o 3;

P es un fosfato o un fosfato modificado, preferentemente un tiofosfato;

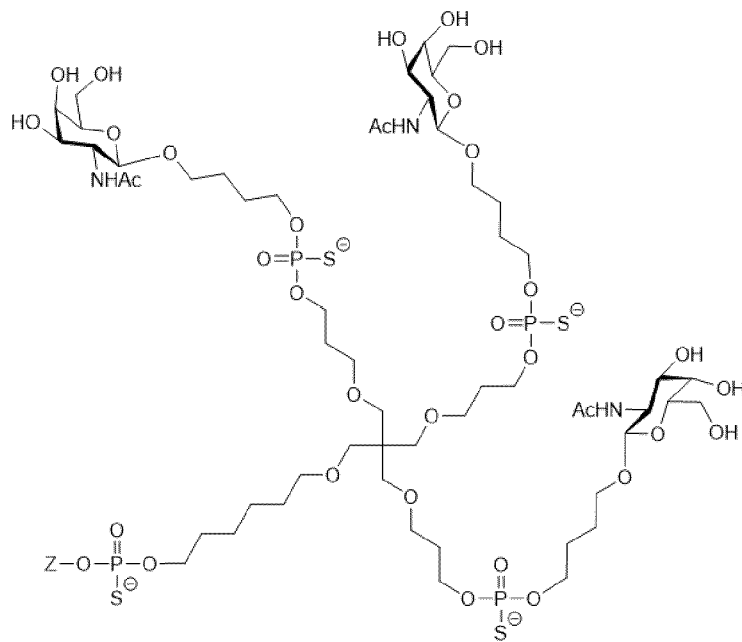
X² es alquileo o un éter de alquileo de fórmula (-CH₂)_n-O-CH₂- donde n = 1 a 6;

A es una unidad de ramificación;

X³ representa una unidad de unión;

en donde un ácido nucleico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está conjugado con X³ a través de un fosfato o un fosfato modificado, preferentemente un tiofosfato, y el ácido nucleico preferentemente está conjugado con X³ a través del extremo 5' de la segunda cadena.

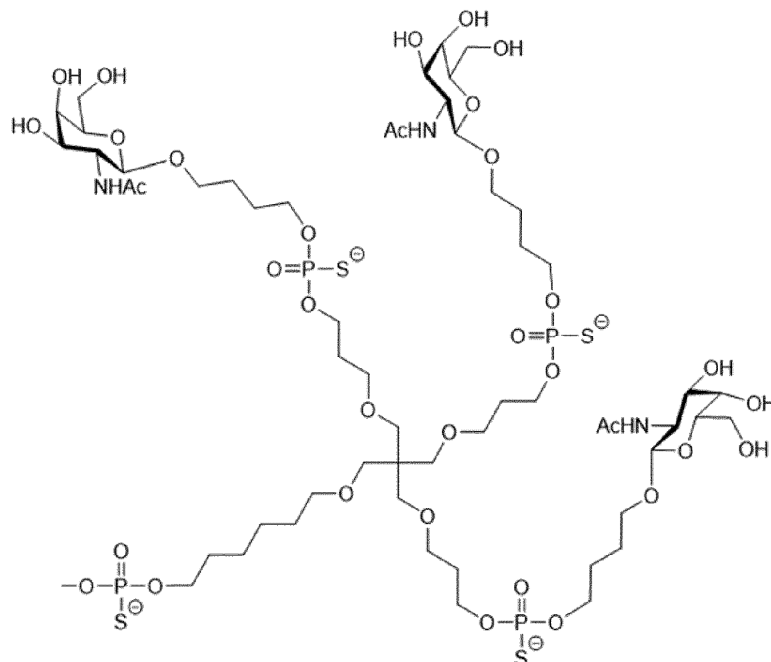
7. El ácido nucleico de cualquier reivindicación anterior, en donde el ácido nucleico está conjugado con un ligando y tiene la siguiente estructura



en la que Z es un ácido nucleico de acuerdo con cualquier reivindicación anterior y el ligando está preferentemente conjugado con el extremo 5' de la segunda cadena.

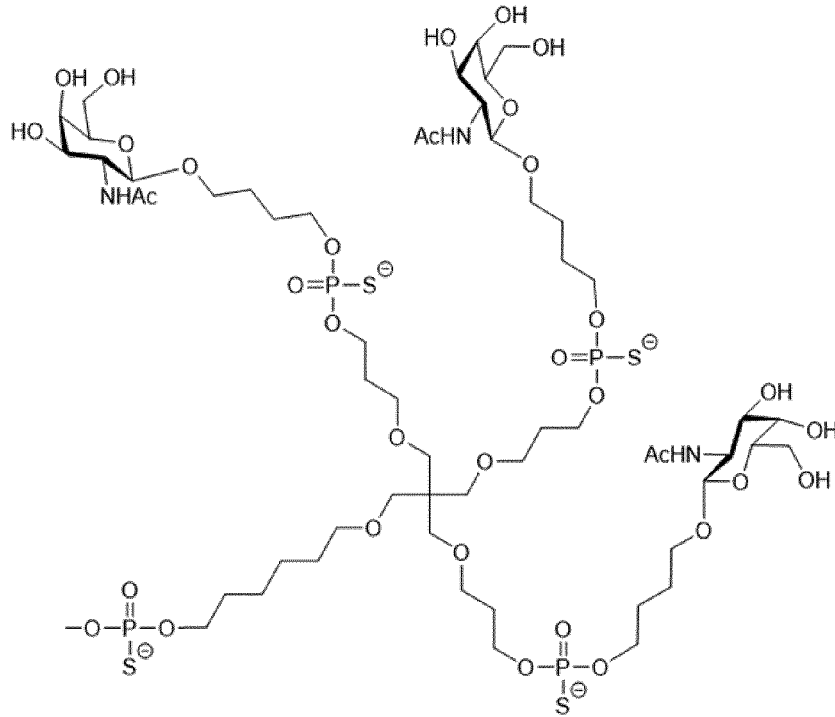
5 8. El ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde la segunda cadena comprende una secuencia de nucleótidos de
 5' [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 164);

10 en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro;
 mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2'-O-metilo;
 (ps) indica un enlace de fosforotioato; y
 15 [ST23 (ps)]3 C6XLT (ps) indica



9. El ácido nucleico de la reivindicación 8, en donde la segunda cadena consiste en una secuencia de nucleótidos de 5' [ST23 (ps)]₃ C6XLT (ps) mC mG mG mU mA mA fU fG fG mA mC mA mG mA mG mU mU (ps) mA (ps) mU 3' (SEQ ID NO: 164);

- 5 en donde fA, fC, fG y fU indican ribonucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro;
 mA, mC, mG y mU indican ribonucleótidos de 2'-O-metilo;
 (ps) indica un enlace de fosfortioato; y
 [ST23 (ps)]₃ C6XLT (ps) indica



- 10 10. Una composición que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y, opcionalmente, un vehículo de administración y/o un excipiente fisiológicamente aceptables y/o un portador y/o un diluyente y/o un tampón y/o un conservante, para su uso como medicamento.
- 15 11. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha composición es para uso en la prevención o el tratamiento o la reducción del riesgo de padecer una enfermedad o una patología, en donde la enfermedad o la patología son una enfermedad cardiovascular.
- 20 12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la enfermedad cardiovascular es ictus, aterosclerosis, trombosis, cardiopatía coronaria o estenosis de la válvula aórtica y/o cualquier otra enfermedad o patología asociadas a niveles elevados de partículas de Lp(a).
- 25 13. Una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y que comprende además un vehículo de administración y/o un excipiente fisiológicamente aceptable y/o un portador y/o un diluyente.

Figura 1

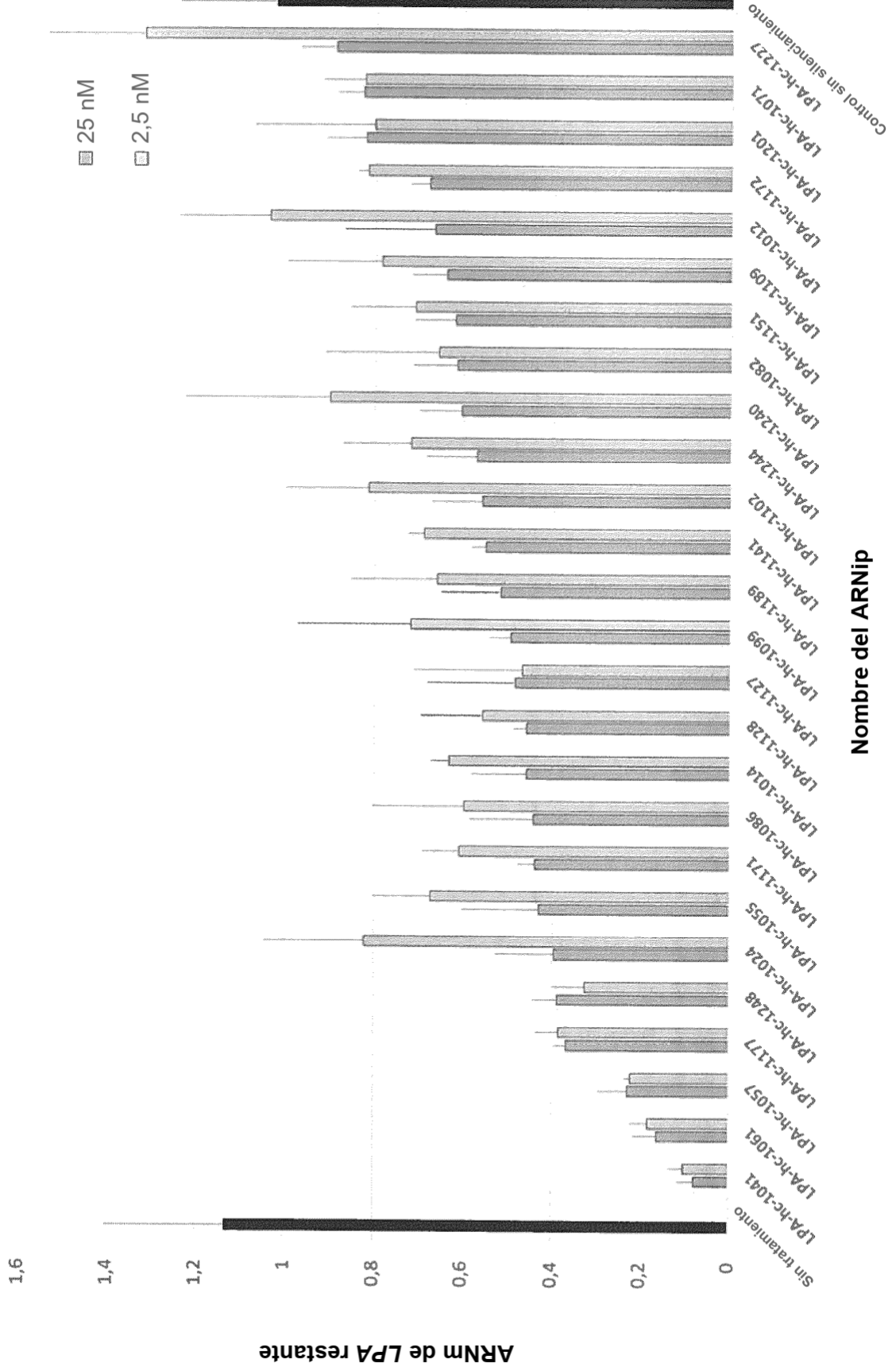


Figura 2A

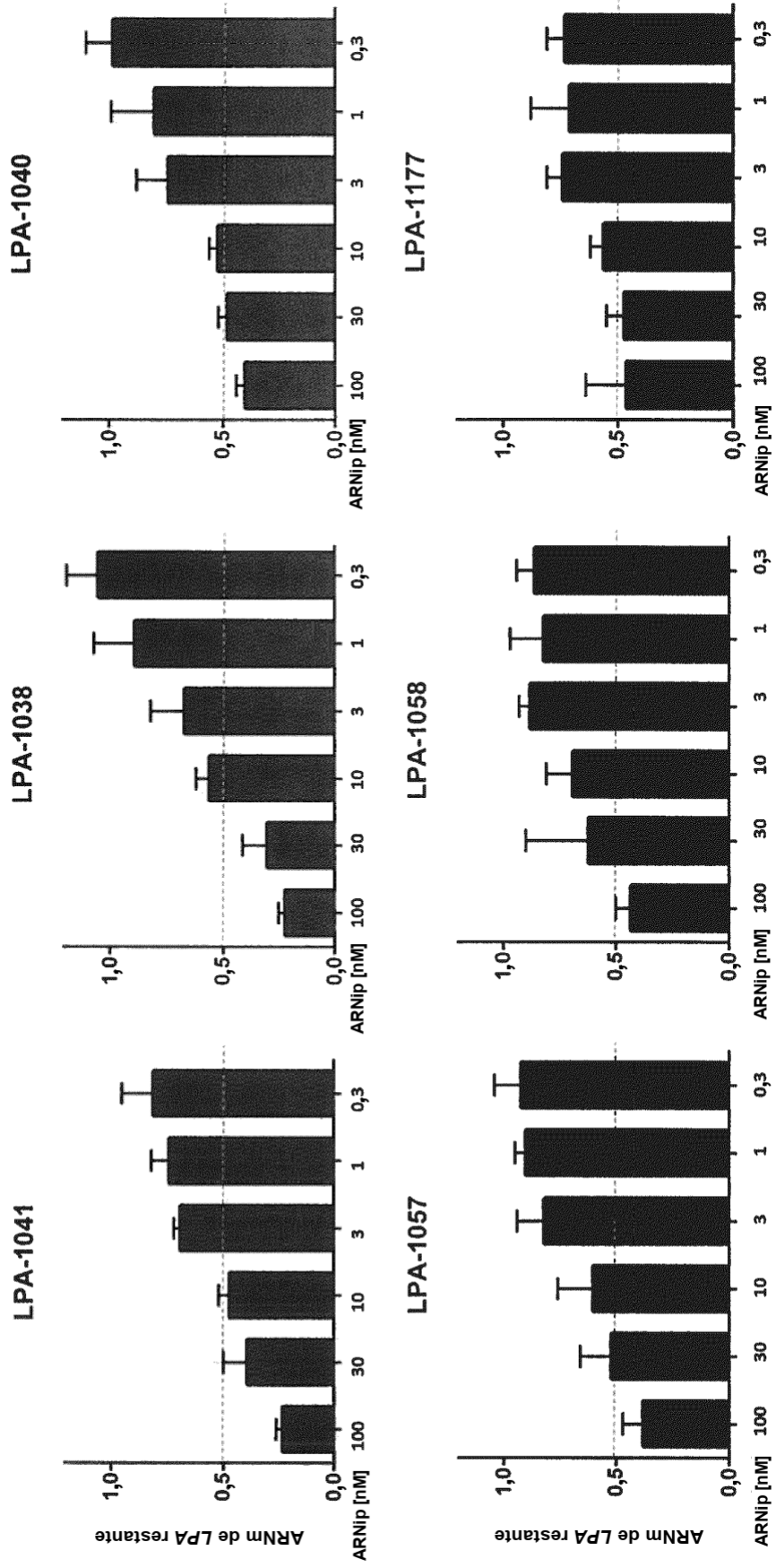


Figura 2B

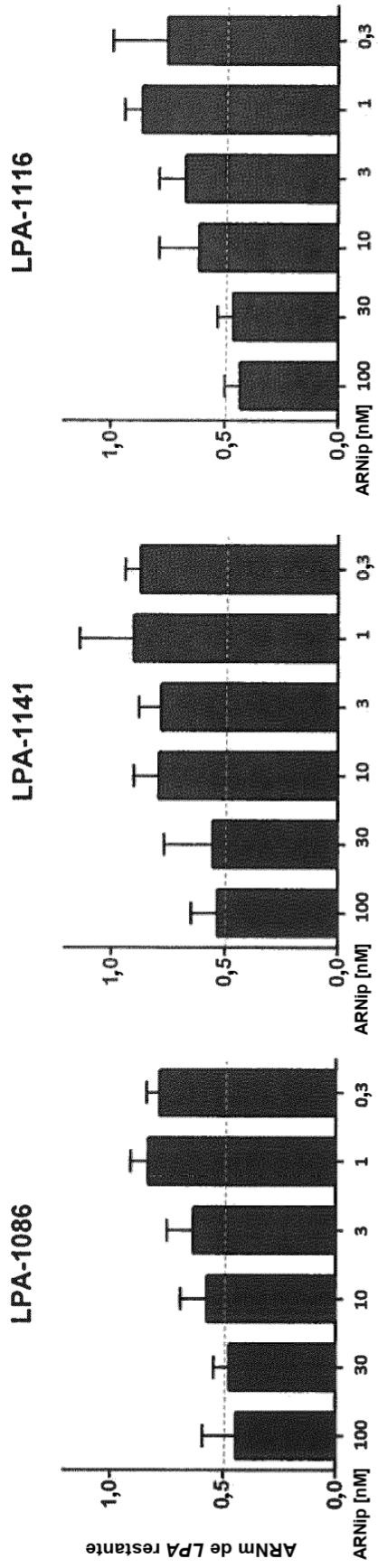


Figura 3

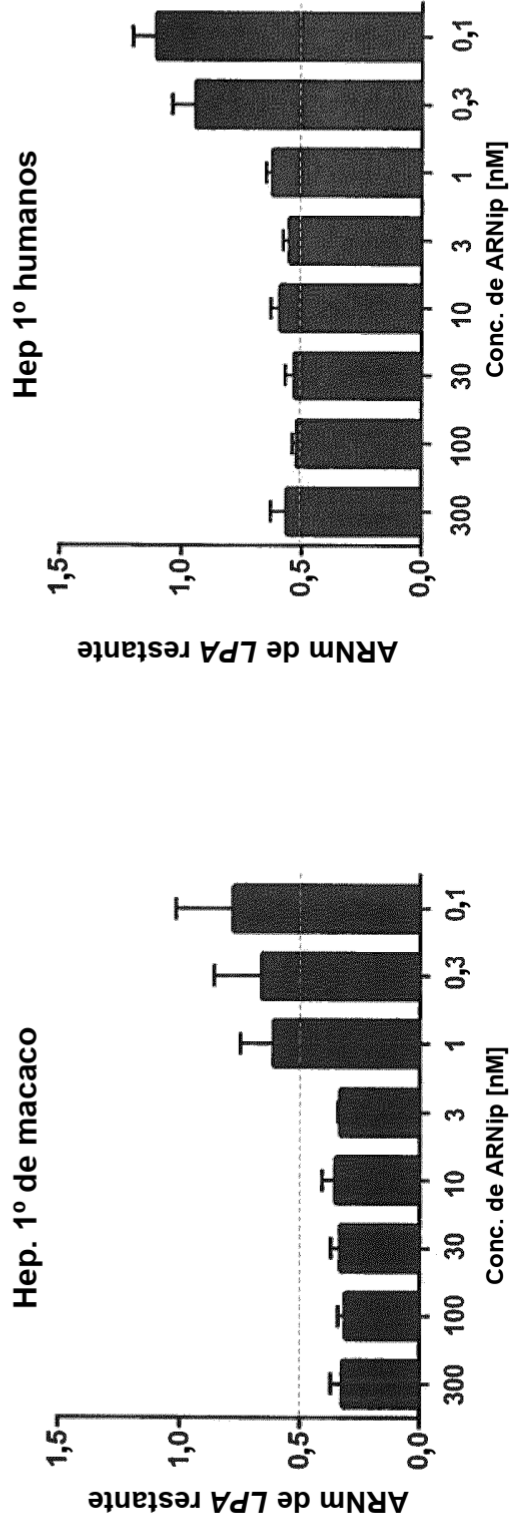


Figura 4

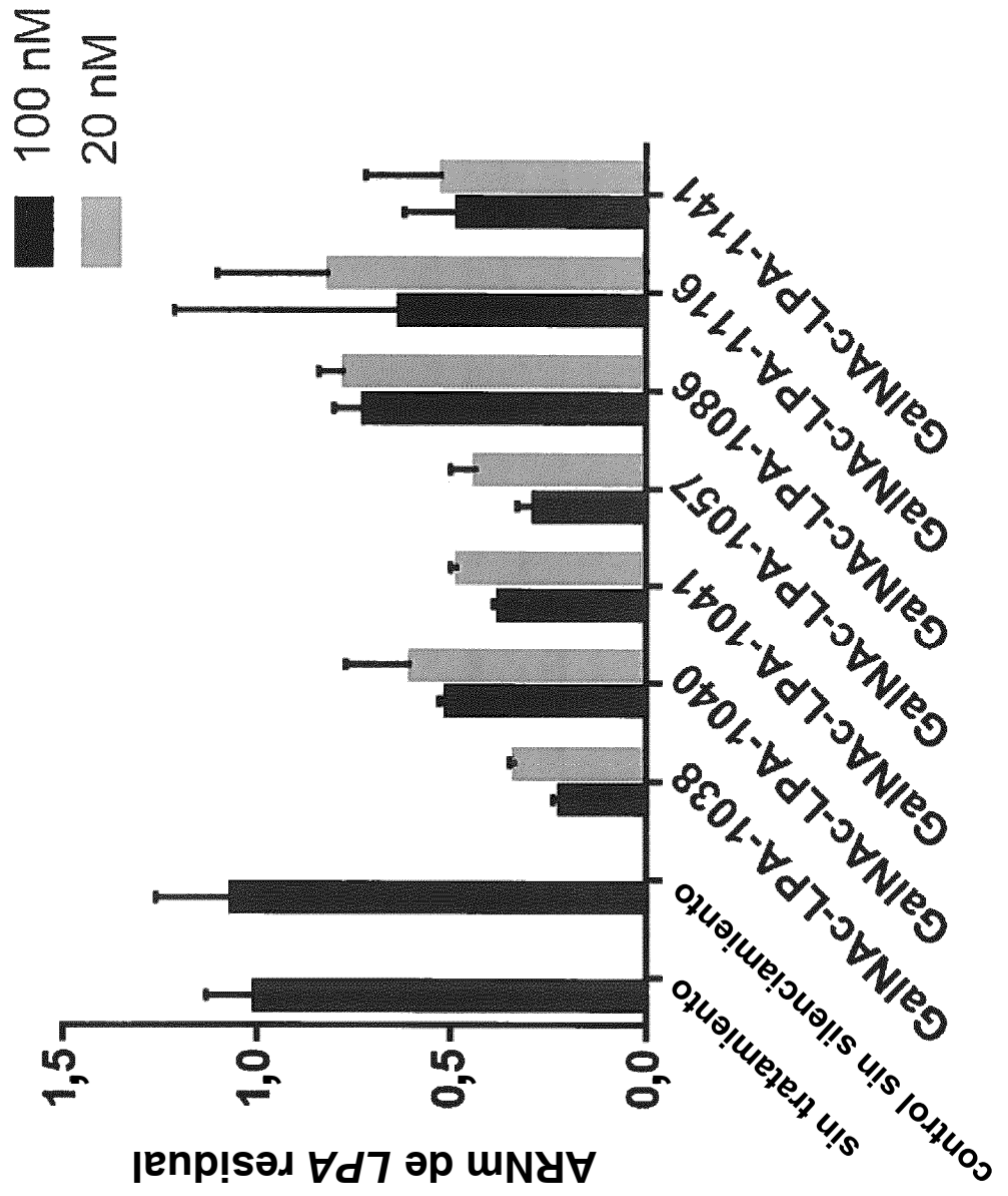


Figura 5

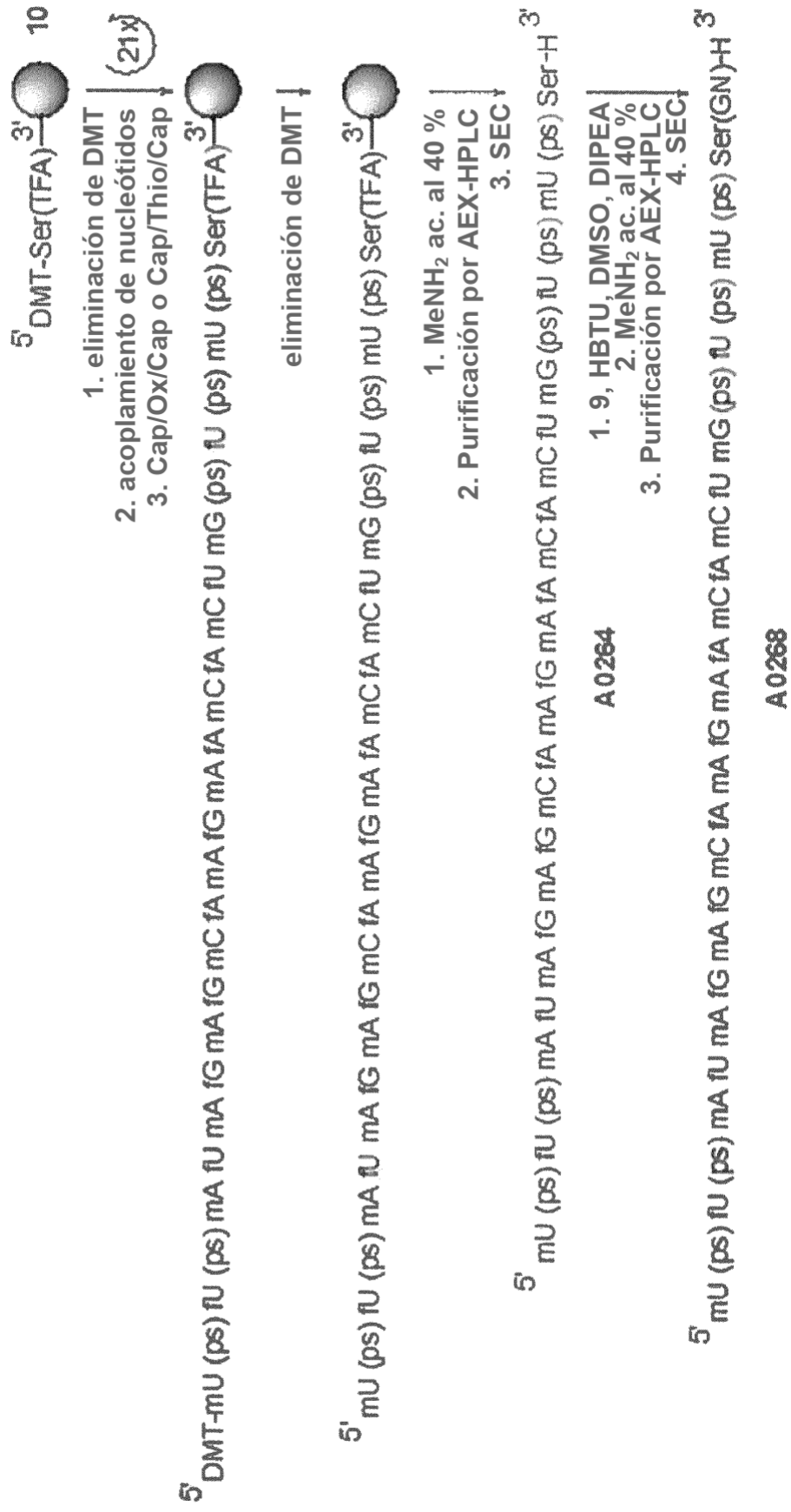


Figura 7a

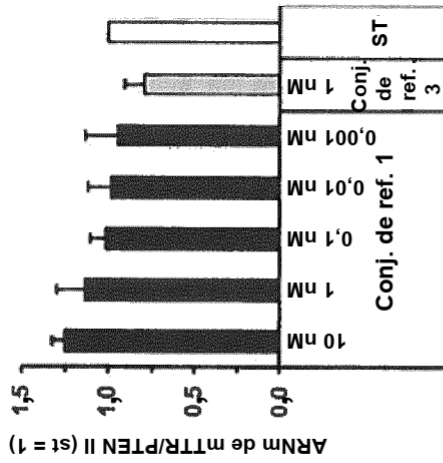


Figura 7b

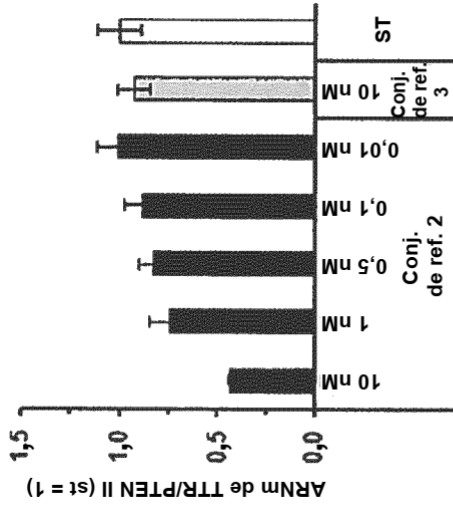


Figura 7c

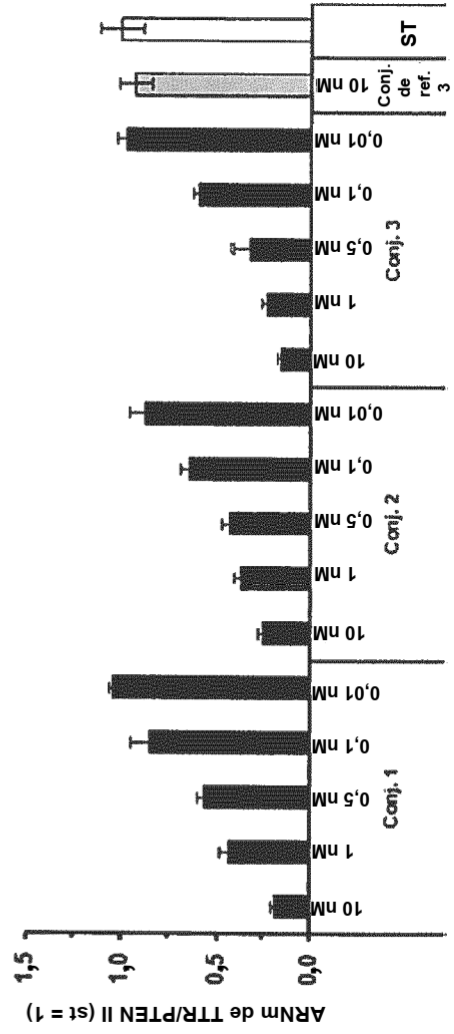


Figura 8

evolución temporal de TTR en suero en C57BL/6 tras la aplicación s.c. de 1 mg/kg de conjugado de ARNip (media \pm DT, n = 4)

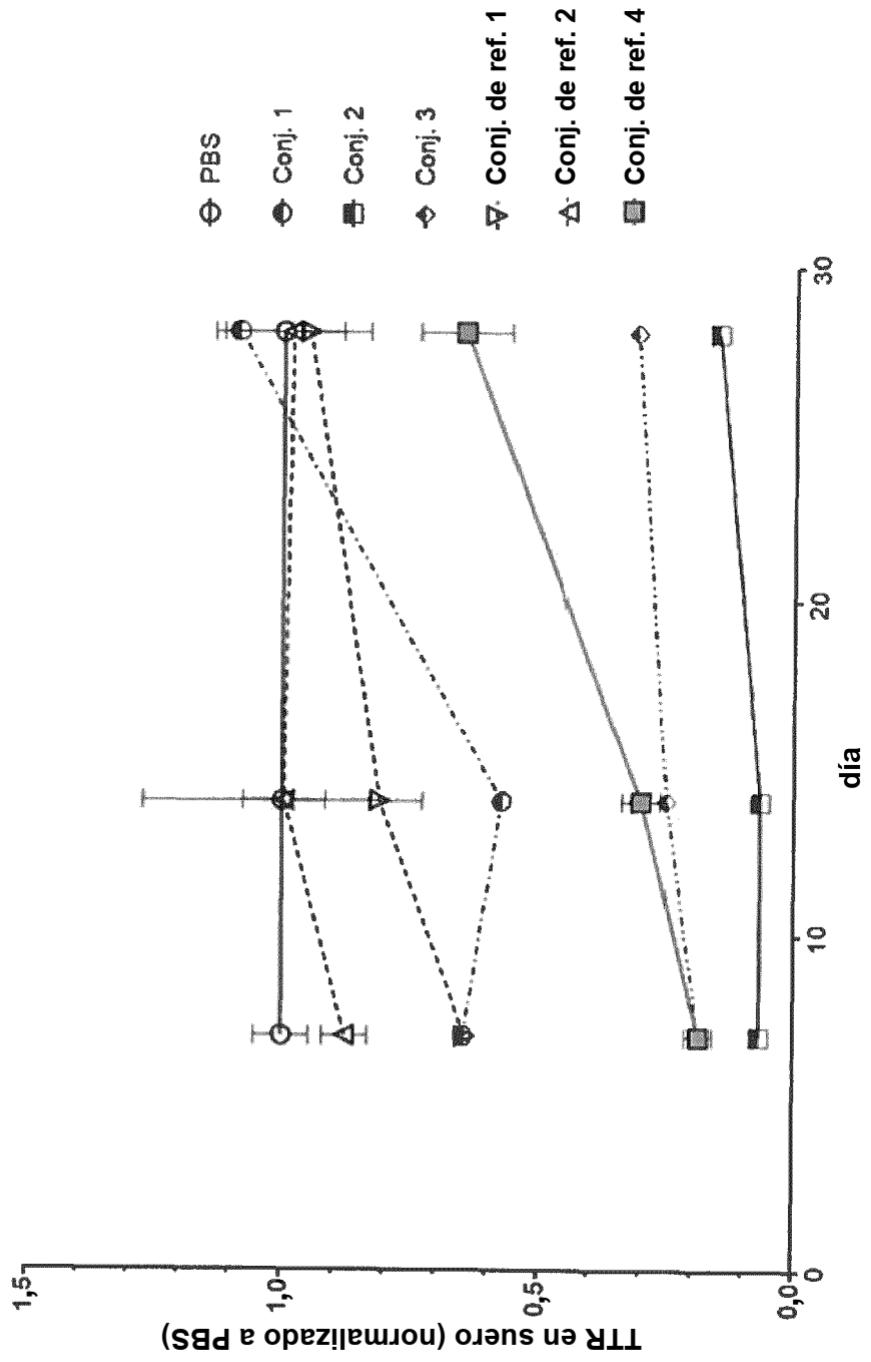


Figura 9

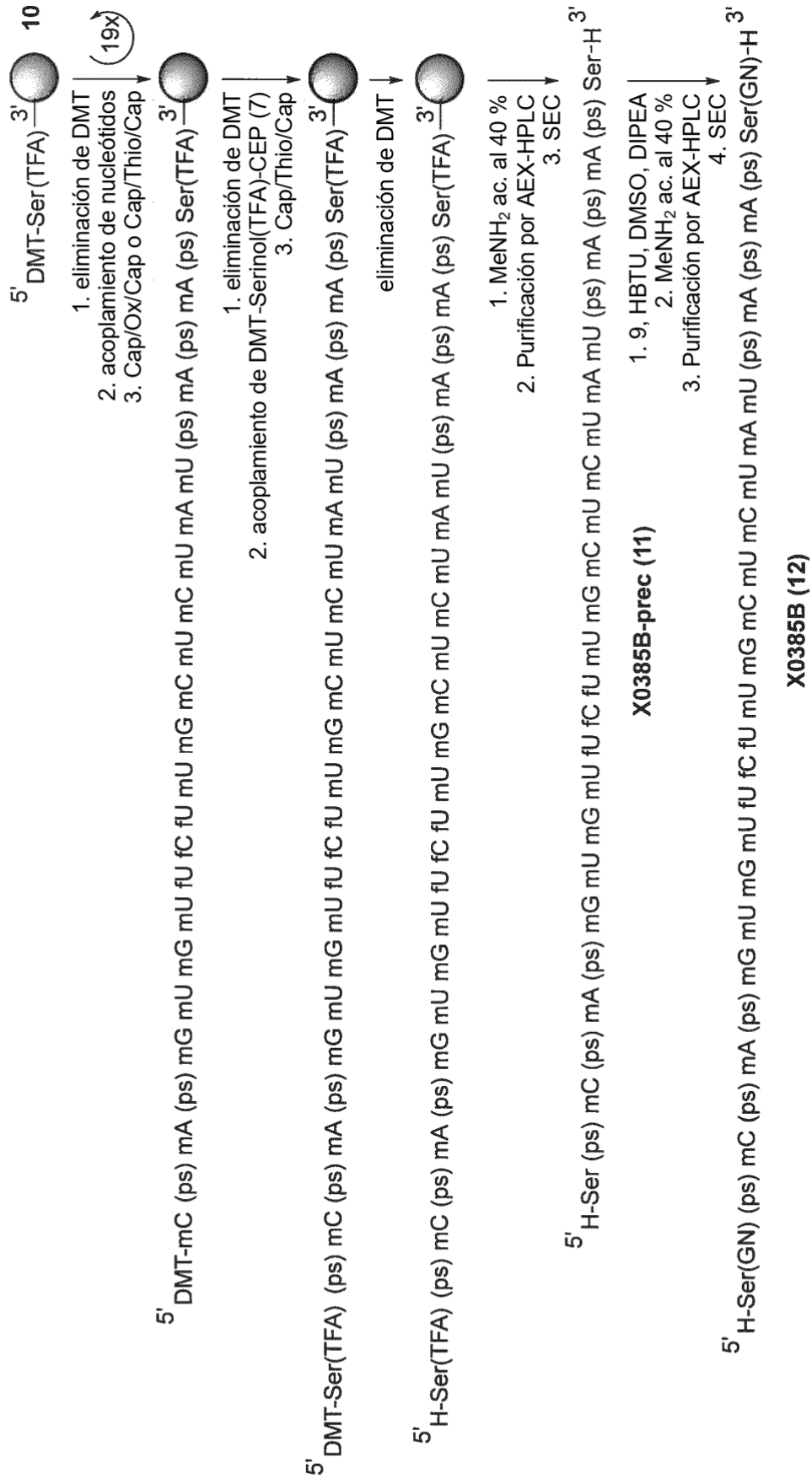


Figura 10

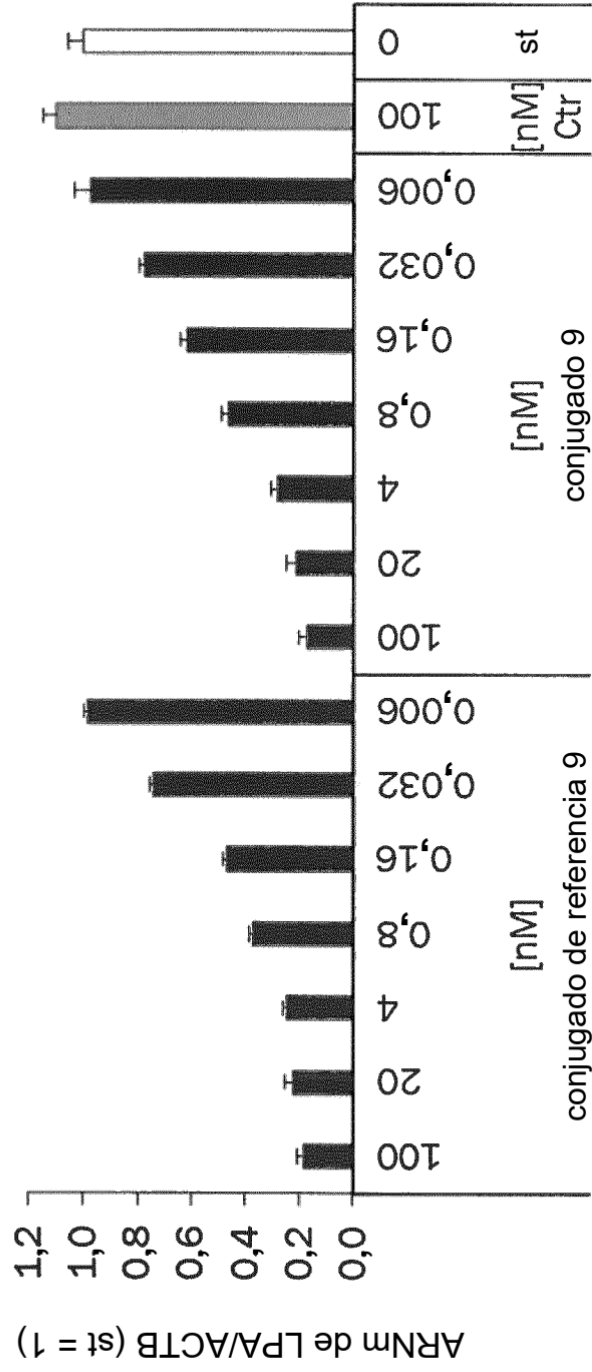


Figura 11A

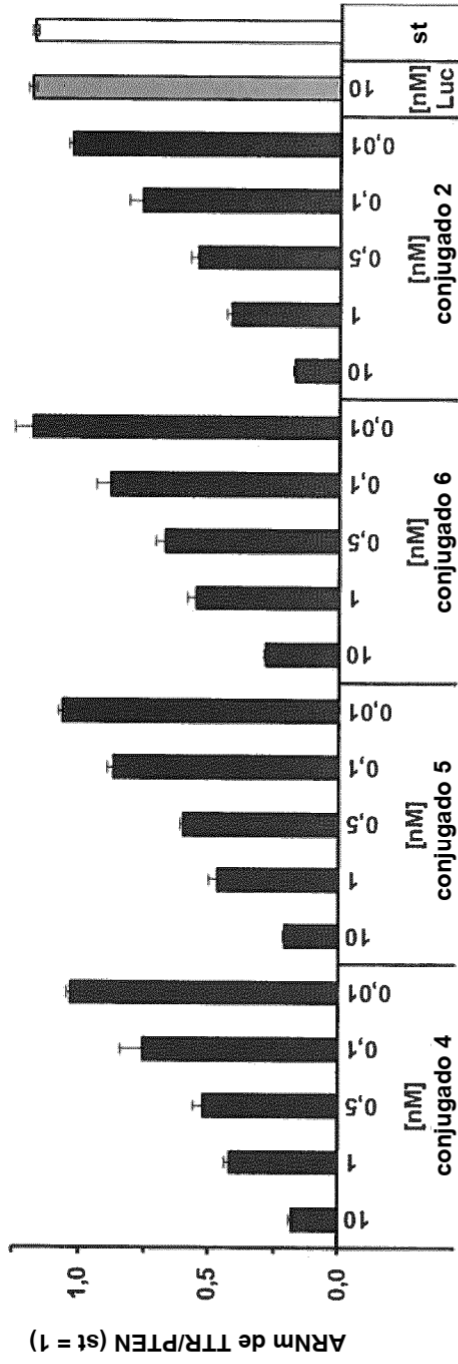


Figura 11B

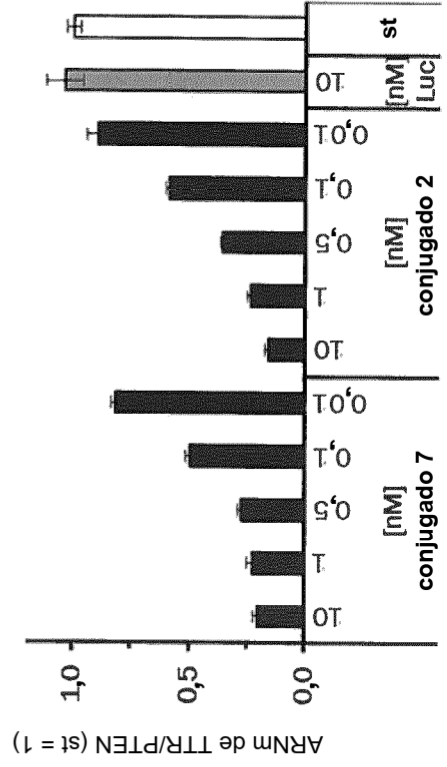


Figura 12A

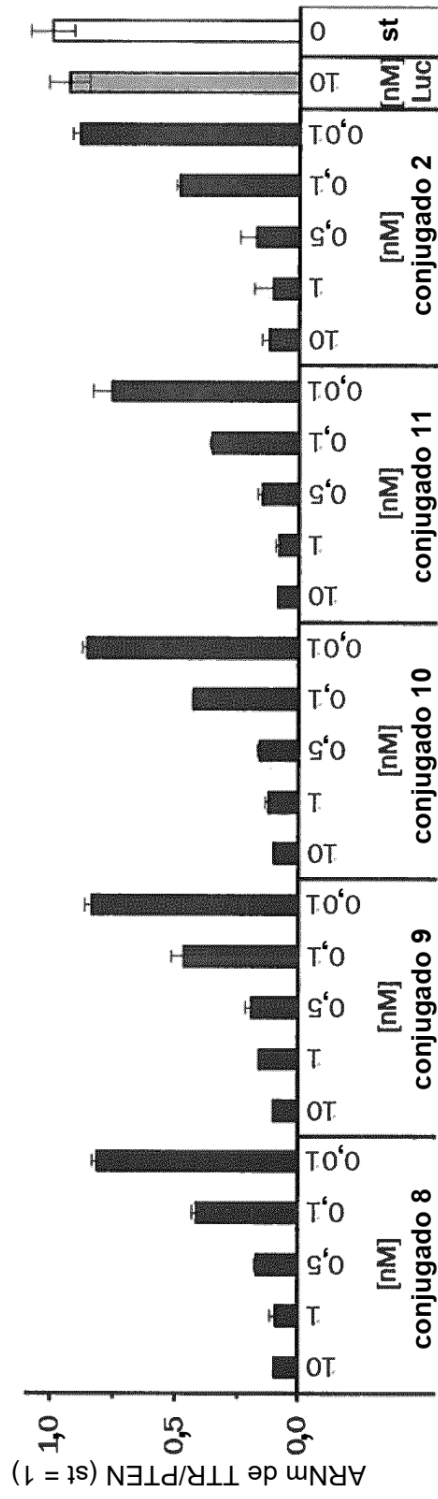
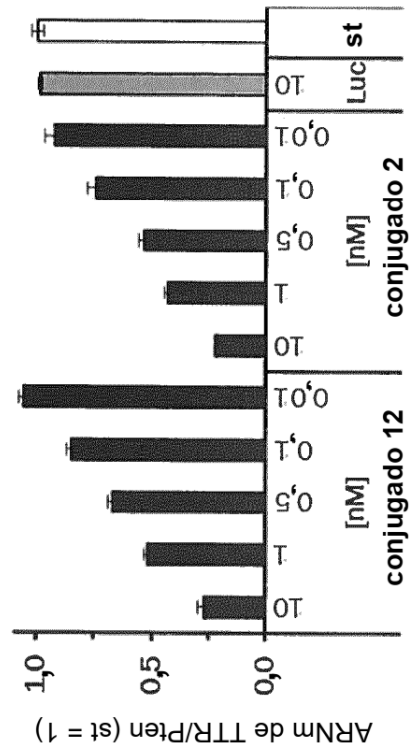


Figura 12B



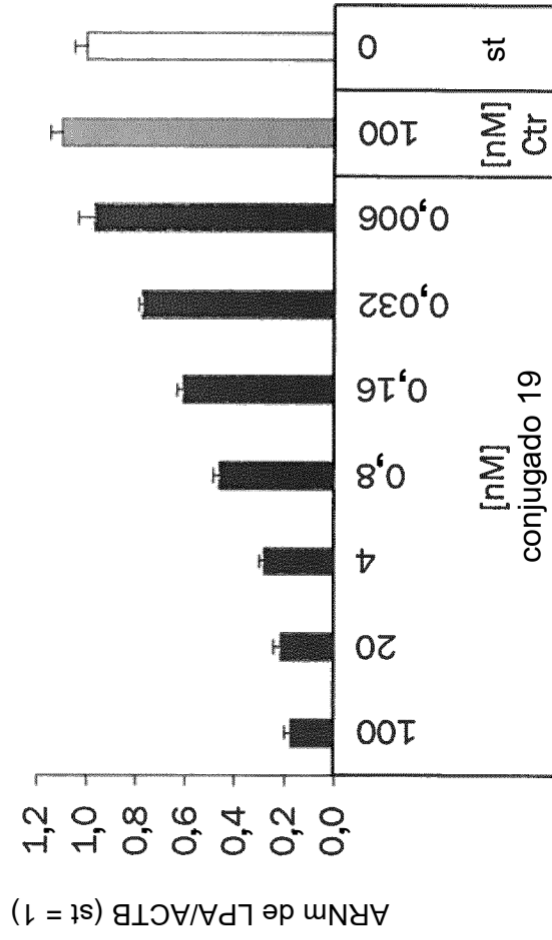


Figura 13

Figura 14

evolución temporal del nivel de transcripción de ALDH2 en el hígado de ratones c57BL/6 tras la aplicación s.c. de los conjugados de GalNAc indicados de la secuencia de ARNm de ALDH2-hcm6 (media + DT, n = 6)

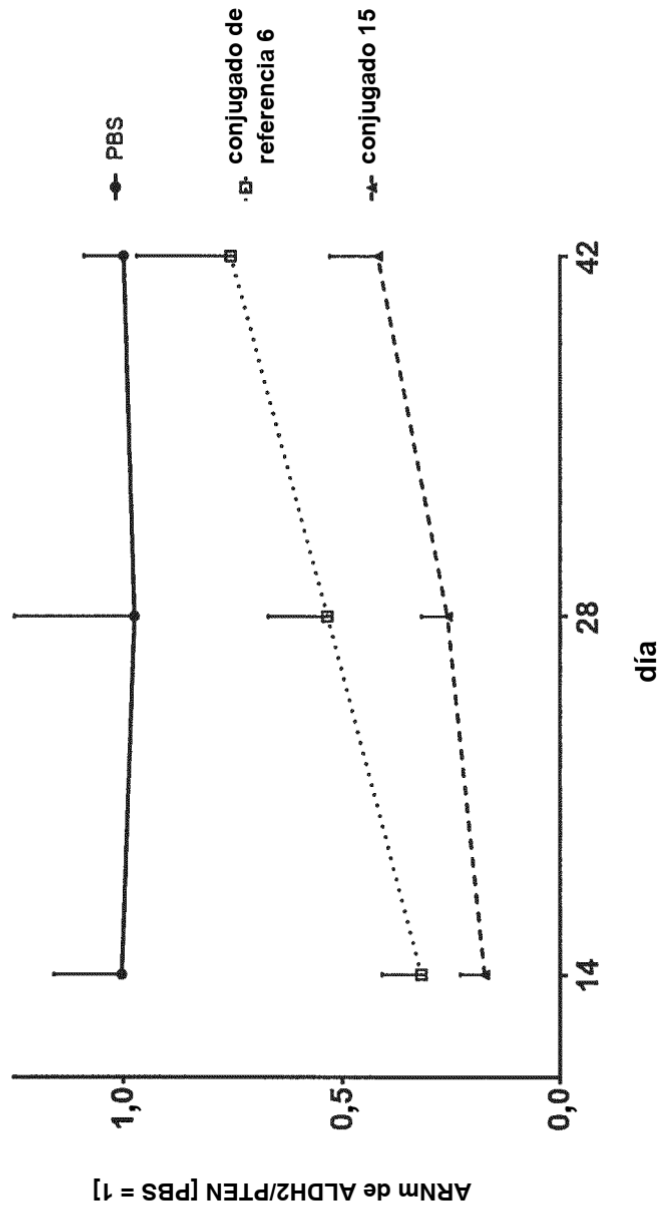


Figura 15

evolución temporal del nivel de transcripción de ALDH2 en el hígado de ratones c57BL/6 tras la aplicación s.c. de los conjugados de GalNAc indicados de la secuencia de ARNip ALDH2-hcm9 (media + DT, n = 6)

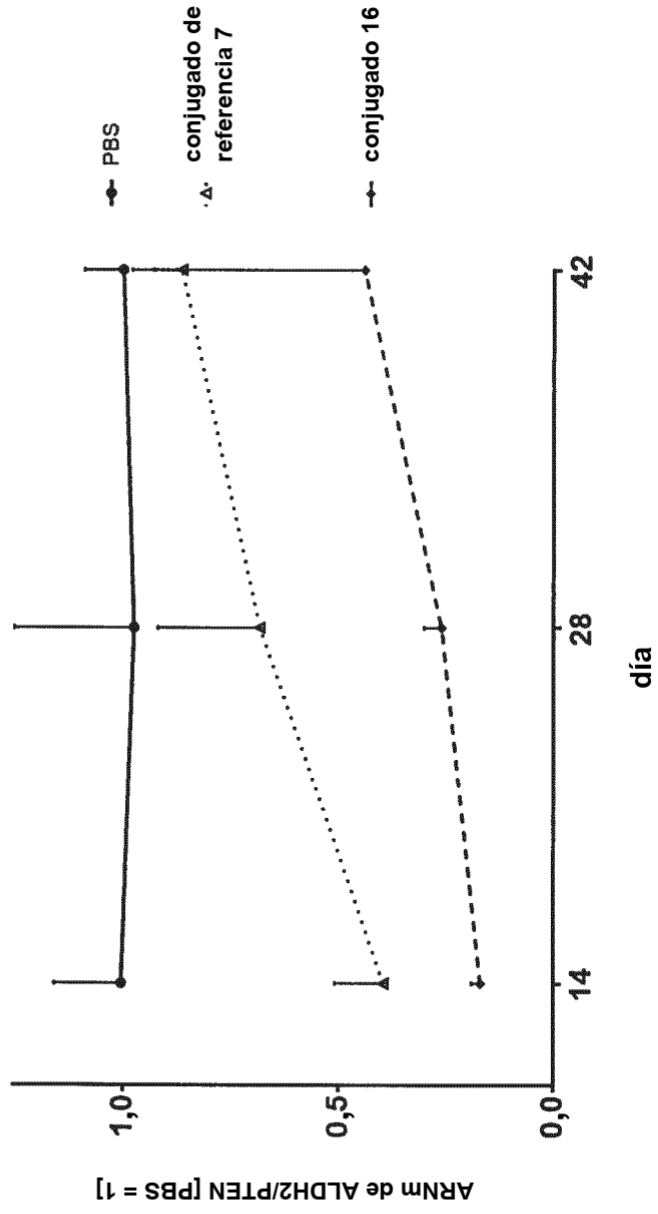


Figura 16

Evolución temporal del nivel de transcripción de TMPRSS6 en el hígado de ratones c57BL/6 en los puntos temporales indicados tras la administración s.c. con 1 mg/kg de los conjugados de GalNAc TMPRSS6-hcm9 (media \pm DT, n = 6)

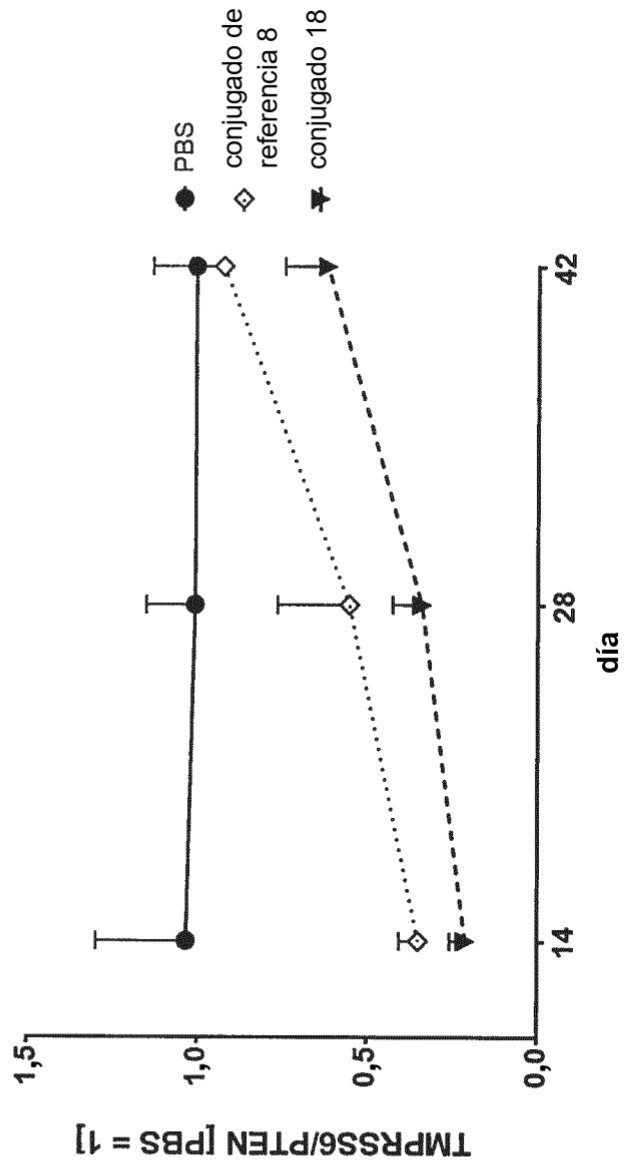


Figura 17

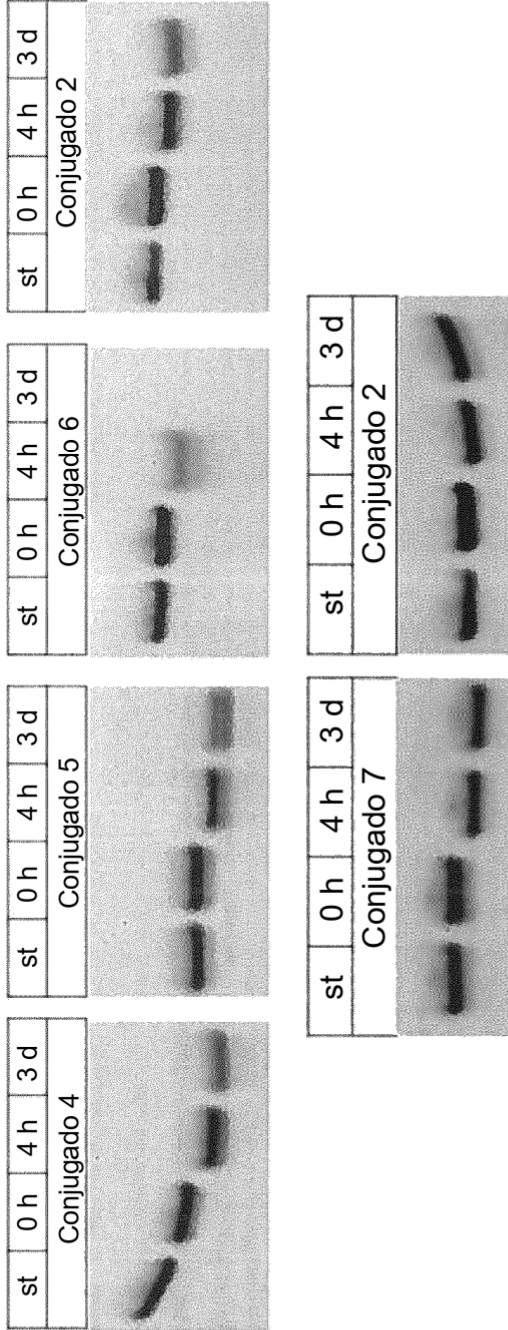


Figura 18

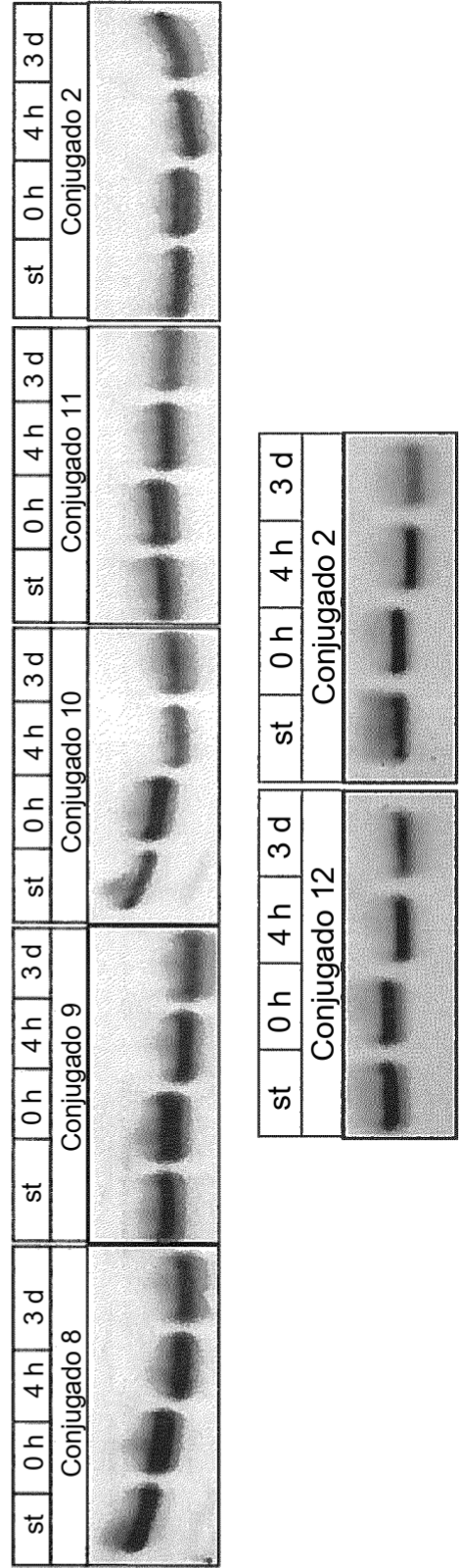


Figura 20

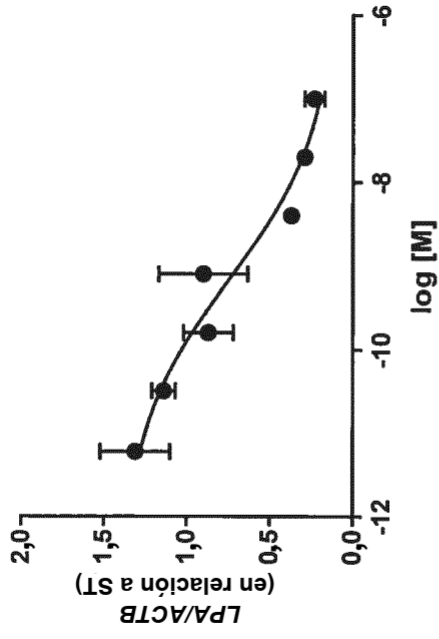


Figura 22

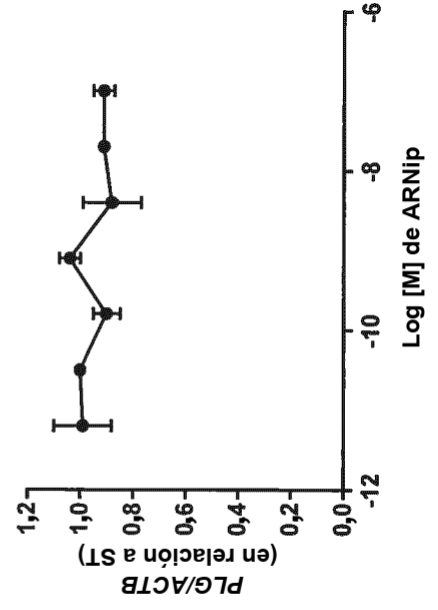


Figura 19

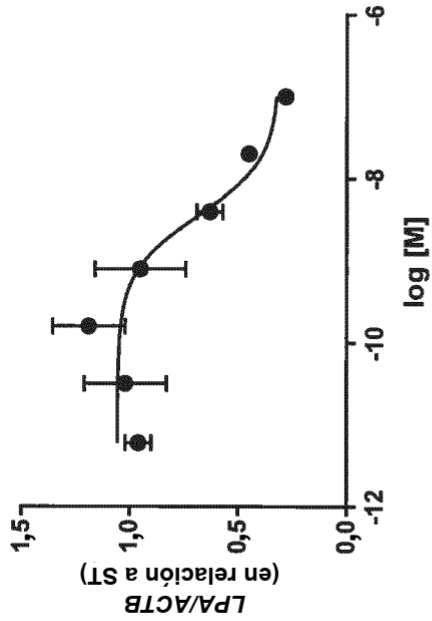


Figura 21

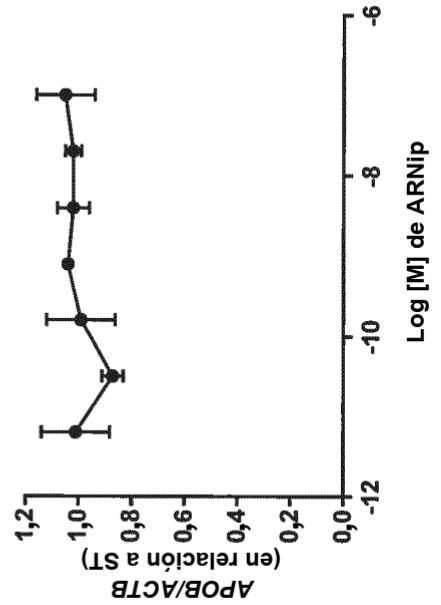


Figura 23

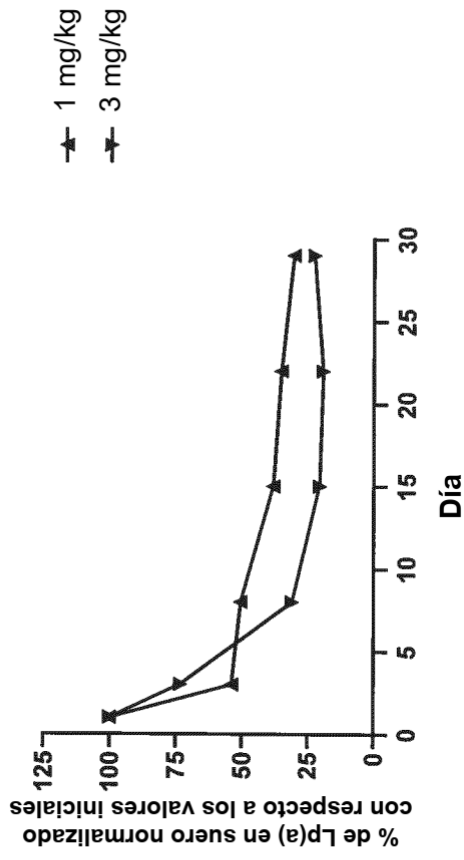


Figura 24

