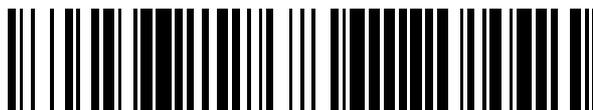


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 667**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**A61K 31/712** (2006.01)

**A61K 47/54** (2007.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2014 PCT/EP2014/063757**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207232**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2014 E 14739708 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3013959**

54 Título: **Oligómeros antisentido y conjugados que se dirigen a PCSK9**

30 Prioridad:

**27.06.2013 EP 13174092**  
**14.11.2013 EP 13192930**  
**14.11.2013 EP 13192938**  
**14.11.2013 WO PCT/EP2013/073858**  
**30.01.2014 EP 14153253**  
**14.05.2014 EP 14168331**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.07.2020**

73 Titular/es:

**ROCHE INNOVATION CENTER COPENHAGEN**  
**A/S (100.0%)**  
**Fremtidsvej 3**  
**2970 Hørsholm, DK**

72 Inventor/es:

**ALBÆK, NANNA;**  
**HEDTJÄRN, MAJ;**  
**LINDHOLM, MARIE;**  
**NIELSEN, NIELS FISKER;**  
**PETRI, ANDREAS y**  
**RAVN, JACOB**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 770 667 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**

Oligómeros antisentido y conjugados que se dirigen a PCSK9

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a compuestos oligoméricos y conjugados de estos que se dirigen al ARNm de Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina tipo 9 (PCSK9) en una célula, lo que conduce a una reducción de la expresión de PCSK9. La reducción de la expresión de PCSK9 es beneficiosa para una variedad de trastornos médicos, tales como la hipercolesterolemia y trastornos relacionados.

Antecedentes de la invención

15 La proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) ha surgido como una diana terapéutica para la reducción del colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-C). PCSK9 aumenta la degradación del receptor de LDL, lo que da como resultado un alto contenido de LDL-C en individuos con alta actividad de PCSK9.

20 Lindholm y otros, *Molecular Therapy* (2012); 20 2, 376-381 informan sobre dos oligonucleótidos antisentido de LNA que se dirigen a PCSK9 que producen una reducción sostenida de LDL-C en primates no humanos después de una dosis de carga (20 mg/kg) y cuatro dosis de mantenimiento semanales (5 mg/kg). Los compuestos usados fueron un SPC5001 de 14mer (SEQ ID NO 1) y un SPC4061 de 13mer. SPC5001 se describe de igual manera en el documento WO2011/009697. La eficacia de estos inhibidores de PCSK9 se ha atribuido a su corta longitud (Krieg y otros, *Molecular Therapy Nucleic Acids* (2012) 1, e6).

25 El documento WO2007/146511 informa sobre oligonucleótidos antisentido de gámpmeros bicíclicos cortos (LNA) que aparentemente son más potentes y menos tóxicos que los compuestos más largos. Los compuestos ejemplificados parecen tener 14nts de longitud.

30 De acuerdo con van Poelgeest y otros, (*American Journal of Kidney Disease*, octubre de 2013;62(4):796-800), la administración del oligonucleótido antisentido de LNA SPC5001 en ensayos clínicos en seres humanos puede dar como resultado una lesión renal aguda.

35 De acuerdo con el documento EP 1 984 381B1, Seth y otros, *Nucleic Acids Symposium Series* 2008 núm. 52 553-554 y Swayze y otros, *Nucleic Acid Research* 2007, vol 35, pp687 - 700, los oligonucleótidos de LNA provocan hepatotoxicidad significativa en animales. De acuerdo con el documento WO2007/146511, la toxicidad de los oligonucleótidos de LNA puede evitarse mediante el uso de gámpmeros de LNA tan cortos como 12 - 14 nucleótidos de longitud. El documento EP 1 984 381B1 recomienda el uso de nucleótidos bicíclicos sustituidos en 6' para disminuir el potencial de hepatotoxicidad de los oligonucleótidos de LNA. De acuerdo con Hagedorn y otros, *Nucleic Acid Therapeutics* 2013, el potencial hepatotóxico del oligonucleótido antisentido puede predecirse a partir de su secuencia y patrón de modificación.

40 Los conjugados de oligonucleótidos se han evaluado ampliamente para su uso en los ARNip, donde se consideran esenciales para obtener suficiente potencia *in vivo*. Por ejemplo, ver el documento WO2004/044141 que se refiere a compuestos oligoméricos modificados que modulan la expresión génica a través de una ruta de interferencia de ARN. Los compuestos oligoméricos incluyen una o más porciones de conjugados que pueden modificar o mejorar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas del compuesto oligomérico unido.

El documento WO2012/083046 informa sobre una porción de direccionamiento de modulador farmacocinético de agrupaciones de galactosa para los ARNip.

50 Por el contrario, los oligonucleótidos antisentido monocatenarios típicamente se administran terapéuticamente sin conjugación o formulación. Los principales tejidos diana para los oligonucleótidos antisentido son el hígado y el riñón, aunque la modalidad antisentido también puede acceder a una amplia variedad de otros tejidos, incluidos los ganglios linfáticos, el bazo y la médula ósea.

55 El documento WO 2005/086775 se refiere al suministro dirigido de agentes terapéuticos a órganos específicos mediante el uso de una porción química terapéutica, un enlazador escindible y un dominio de marcado. El enlazador escindible puede ser, por ejemplo, un grupo disulfuro, un péptido o un dominio oligonucleotídico escindible por enzimas de restricción.

60 El documento WO 2011/126937 se refiere al suministro intracelular dirigido de oligonucleótidos a través de la conjugación con ligandos de molécula pequeña.

El documento WO2009/025669 se refiere a enlazadores poliméricos (polietilenglicol) que contienen porciones de disulfuro de piridilo. Ver también Zhao y otros, *Bioconjugate Chem.* 2005 16 758 - 766.

Chaltin y otros, Bioconjugate Chem. 2005 16 827 - 836 informa sobre oligonucleótidos mono, di y tetraméricos modificados con colesterol usados para incorporar oligonucleótidos antisentido en liposomas catiónicos, para producir un sistema de suministro dendrímérico. El colesterol se conjuga con los oligonucleótidos a través de un enlazador de lisina.

5 Se han usado otros conjugados de colesterol no escindibles para dirigir los ARNip y los antagomirs al hígado - ver, por ejemplo, Soutscheck y otros, Nature 2004 vol. 432 173 - 178 y Krützfeldt y otros, Nature 2005 vol 438, 685 - 689. Para los ARNip y los antagomirs parcialmente fosforotiolados, se encontró que el uso del colesterol como una entidad de direccionamiento al hígado es esencial para la actividad *in vivo*.

10 El documento WO2009/134487 describe los ARNbc para tratar enfermedades provocadas por la expresión del gen de PCSK9.

#### Objetivo de la invención

15 Por lo tanto, existe una necesidad de compuestos antisentido que se dirijan a PCSK9, que sean tan eficaces como SPC5001, pero que tengan un riesgo de toxicidad reducido, en particular una toxicidad renal reducida.

20 De acuerdo con la presente invención esto se ha logrado mediante la identificación de nuevas secuencias de PCSK9 humano que son particularmente eficaces de dirigir mediante el uso del enfoque antisentido (SEQ ID NO 33 y SEQ ID NO 34), así como variantes más largas de la secuencia de SPC5001 que retienen o se mejoran sobre la notable potencia de SPC5001 sin problemas de toxicidad. Los oligonucleótidos antisentido descritos en la presente descripción pueden mejorarse adicionalmente mediante el uso de conjugados, que se ha encontrado que mejoran en gran medida el índice terapéutico de los oligonucleótidos antisentido de LNA.

25 Los compuestos de la presente invención son inhibidores potentes y no tóxicos de PCSK9, útiles para el tratamiento de la hipercolesterolemia y trastornos relacionados.

#### Resumen de la invención

30 El oligómero de la invención es un gápmero de LNA, que comprende entre 16 - 20 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31.

La invención proporciona un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende el oligómero de acuerdo con la invención, y al menos una porción no nucleotídica o no polinucleotídica unida covalentemente a dicho oligómero.

35 La invención también proporciona un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende el oligómero (A) de acuerdo con la invención, y al menos una porción no nucleotídica o no polinucleotídica unida covalentemente a dicho oligómero (C), opcionalmente a través de una región enlazadora (B y/o Y) colocada entre la secuencia contigua del oligómero y la porción de conjugado.

40 En algunas modalidades, la invención también proporciona un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende el oligómero de la invención.

La invención proporciona un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende

45 a. un oligómero antisentido (A) de entre 16 - 22 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31, y en donde dicho oligómero antisentido es un gápmero de LNA, y

50 b. al menos una porción de conjugado (C) que se dirige al receptor de asialoglicoproteína unido covalentemente a dicho oligómero (A).

La invención también proporciona un compuesto seleccionado del grupo que consiste en la SEQ ID NO 2, 3, 18 y 19.

55 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligómero o el conjugado de acuerdo con la invención, y un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

60 La invención proporciona un oligómero o conjugado o composición farmacéutica de acuerdo con la invención, para su uso como un medicamento, tal como para el tratamiento de hipercolesterolemia o trastorno relacionado, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, por ejemplo, mutaciones de ganancia de función en PCSK9, desequilibrio de colesterol asociado a HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar (FCHL) o hipercolesterolemia familiar (FHC), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, enfermedad arterial coronaria (CAD) y enfermedad cardíaca coronaria (CHD).

65 La invención proporciona el uso de un oligómero o conjugado o composición farmacéutica de la invención, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la hipercolesterolemia o un trastorno relacionado, tal como un

5 trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, por ejemplo, mutaciones de ganancia de función en PCSK9, desequilibrio de colesterol asociado a HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar (FCHL) o hipercolesterolemia familiar (FHC), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, enfermedad arterial coronaria (CAD) y enfermedad cardíaca coronaria (CHD).

10 Se describe un método para tratar la hipercolesterolemia o un trastorno relacionado, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, por ejemplo, mutaciones de ganancia de función en PCSK9, desequilibrio de colesterol asociado a HDL/LDL, dislipidemias, por ejemplo, hiperlipidemia familiar (FCHL) o hipercolesterolemia familiar (FHC), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, enfermedad arterial coronaria (CAD) y enfermedad cardíaca coronaria (CHD), dicho método que comprende administrar una cantidad eficaz de un oligómero o conjugado o composición farmacéutica de acuerdo con la invención, a un paciente que padece de, o es probable que sufra de hipercolesterolemia o un trastorno relacionado.

15 La invención proporciona un método *in vitro* para la inhibición de PCSK9 en una célula que expresa PCSK9, dicho método que comprende administrar un oligómero o conjugado o composición farmacéutica de acuerdo con la invención a dicha célula para inhibir PCSK9 en dicha célula.

20 La invención también proporciona un oligómero de acuerdo con la invención que comprende una región contigua de 10 - 22, tal como 12 - 18, tal como 13, 14, 15, 16 o 17 nucleósidos unidos a fosforotioato, (es decir, la región A, que típicamente es complementaria a una región correspondiente de la secuencia diana, tal como la SEQ ID NO 46) y que comprende además entre 1 y 6 nucleósidos de ADN que son contiguos al oligómero de LNA, en donde los enlaces internucleósidos entre el ADN y/o adyacentes al(a los) nucleósido(s) de ADN, son fisiológicamente lábiles, tal como lo son los enlaces fosfodiéster. Tal oligómero de LNA puede estar en forma de un conjugado, como se describe en la presente descripción, o puede ser, por ejemplo, un producto intermedio a usar en una etapa de conjugación posterior. Cuando se conjuga, el conjugado puede ser o comprender, por ejemplo, un esterol, tal como colesterol o tocoferol, o puede ser o comprender un carbohidrato (no nucleotídico), tal como un conjugado de GalNAc, u otro conjugado como se describe en la presente descripción.

30 Se describe además un oligómero gápmero que comprende al menos un cET, tales como nucleótidos (S)-cET, de entre 10 - 22, tal como 12 - 18, tal como 13, 14, 15, 16 o 17 nucleótidos de longitud, que se dirige (*es decir*, tiene una secuencia que es complementaria a una parte correspondiente) a PCSK9 humano.

35 Breve descripción de las figuras

Figura 1: Ejemplos de conjugados de tri-GalNAc que pueden usarse. Los conjugados 1 - 4 ilustran 4 porciones de conjugados de GalNAc adecuados, y los conjugados 1a - 4a se refieren a los mismos conjugados con una porción enlazadora adicional (Y) que se usa para unir el conjugado al oligómero (región A o a un enlazador bioescindible, tal como la región B). La línea ondulada representa la unión covalente al oligómero.

40 Figura 2: Ejemplos de porciones de conjugados de colesterol y tocoferol. Los conjugados 5a y 6a se refieren a los mismos conjugados con una porción enlazadora adicional (Y) que se usa para unir el conjugado al oligómero (región A o a un enlazador bioescindible, tal como la región B). La línea ondulada representa la unión covalente al oligómero.

45 Figura 3: Compuestos de LNA específicos. Los beta-D-oxi LNA se identifican por un superíndice <sup>L</sup> después de la letra, el subíndice <sub>s</sub> representa un enlace fosforotioato, el superíndice <sup>Me</sup> que precede a una C mayúscula representa LNA 5-metil citosina, los nucleótidos no LNA son nucleótidos de ADN (sin superíndice L).

50 Figura 4: Ejemplos de conjugados de colesterol de los compuestos de LNA. Los beta-D-oxi LNA se identifican por un superíndice <sup>L</sup> después de la letra, el subíndice <sub>s</sub> representa un enlace fosforotioato, el subíndice <sub>o</sub> representa un enlace fosfodiéster, el superíndice <sup>Me</sup> que precede a una C mayúscula representa LNA 5-metil citosina, los nucleótidos no LNA son nucleótidos de ADN (sin superíndice L).

55 Figura 5: Ejemplos de conjugados de GalNAc de los compuestos de LNA. Los conjugados corresponden esencialmente a Conj2a en la Figura donde la línea ondulada se sustituye con el oligómero de LNA. Los beta-D-oxi LNA se identifican por un superíndice <sup>L</sup> después de la letra, el subíndice <sub>s</sub> representa un enlace fosforotioato, el superíndice <sup>Me</sup> que precede a una C mayúscula representa LNA 5-metil citosina, los nucleótidos no LNA son nucleótidos de ADN (sin superíndice L).

60 Figura 5A: Estructura detallada de la SEQ ID NO 18

Figura 5B: Estructura detallada de la SEQ ID NO 19

Figura 6: Ejemplo de grupo de conjugado a FAM.

65 Figura 7: Conjugados de LNA-FAM con y sin enlaces fosfodiéster escindibles. Los beta-D-oxi LNA se identifican por un superíndice <sup>L</sup> después de la letra, el subíndice <sub>s</sub> representa un enlace fosforotioato, el subíndice <sub>o</sub> representa un enlace

fosfodiéster, el superíndice <sup>Me</sup> que precede a una C mayúscula representa LNA 5-metil citosina, los nucleótidos no LNA son nucleótidos de ADN (sin superíndice L).

Figura 8: Gápmeros anti-PCSK9 clasificados para la potencia *in vitro*.

Figura 9: Gápmeros anti-PCSK9 seleccionados clasificados para potencia *in vitro*.

Figura 10: *Potencia in vitro* de compuestos anti-PCSK9 seleccionados y cálculos de IC50.

Figura 11: *Datos de ALT in vivo* para conjugados anti-PCSK9 seleccionados.

Figura 12: El enlace L internucleósidos puede ser, por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, tal como fosfodiéster. PO es un enlace fosfodiéster. El compuesto a) tiene una región B con un solo ADN (o ARN), el enlace entre la segunda y la primera región es PO. El compuesto b) tiene dos nucleósidos de ADN/ARN (tal como ADN) unidos por un enlace fosfodiéster. El compuesto c) tiene tres nucleósidos de ADN/ARN (tal como el ADN) unidos por enlaces fosfodiéster. En algunas modalidades, la Región B puede extenderse aún más con ADN/ARN con fosfodiéster adicionales (tales como nucleósidos de ADN). El grupo de conjugado (Marcado X, de otra manera la región C en la presente descripción) se ilustra en el lado izquierdo de cada compuesto (por ejemplo, Colesterol, GalNAc, Conj1 - 4, 1a - 4a y 5 o 6), y puede, opcionalmente, estar unido covalentemente al nucleósido terminal de la región B a través de un grupo fosfórico de enlace a nucleósido, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o puede estar unido a través de un enlace alternativo, por ejemplo, un enlace de triazol (ver L en los compuestos d), e) y f

Figura 13. Donde los compuestos comprenden el enlazador opcional (Y) entre la tercera región (conjugada) (X) y la segunda región (región B). Misma nomenclatura que en la Figura 12. Los enlazadores adecuados se describen en la presente descripción e incluyen, por ejemplo, enlazadores alquilo, por ejemplo, enlazadores C6. En los compuestos a), b) y c), el enlazador entre X y la región B está unido a la región B a través de un grupo fosfórico de enlace a nucleósido, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o puede estar unido a través de un enlace alternativo, por ejemplo, un enlace triazol (Li). En estos compuestos Lii representa el enlace internucleosídico entre la primera (A) y la segunda región (B). Los compuestos d), e) y f) comprenden además un enlazador (Y) entre la región B y el grupo de conjugado, y la región Y puede unirse a la región B a través de, por ejemplo, un grupo fosfórico de enlace a nucleósido, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o en algunas modalidades un enlace triazol. Además, o alternativamente X puede ser un grupo de activación o un grupo reactivo. X puede estar unido covalentemente a la región B a través de un grupo fosfórico de enlace a nucleósido, tal como fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, boranofosfato o metilfosfonato, o puede estar unido a través de un enlace alternativo, por ejemplo, un enlace triazol.

Figura 14. Silenciamiento del ARNm de PCSK9 con conjugados de colesterol *in vivo*. Se inyectó a los ratones una dosis única de 10 mg/kg de oligonucleótido antisentido de LNA no conjugado (#40) o cantidades equimolares de oligonucleótidos antisentido de LNA conjugados a colesterol con diferentes enlazadores y sacrificados los días 1, 3, 7 y 10 después de la dosificación. Se aisló ARN de hígado y riñón y se sometió a RT-qPCR específica de PCSK9 A. Cuantificación del ARNm de PCSK9 a partir de muestras de hígado normalizadas con respecto a BACT y se mostró como porcentaje del promedio de controles de solución salina equivalentes B. Cuantificación del ARNm de PCSK9 a partir de muestras de riñón normalizadas con respecto a BACT y se muestra como porcentaje del promedio de controles de solución salina equivalentes.

Figura 15. Expresión de Kim-1 a partir del estudio de seguridad en ratas (ver el Ejemplo 5).

Figura 16: PCSK9 en suero y colesterol asociado a LDL en muestras de monos cynomolgus inyectados cuatro veces (una inyección/semana) con 0,5 o 1,5 mg/kg/semana de la SEQ ID 2 y 18.

Figura 17. PCSK9 en suero y colesterol asociado a LDL en muestras de monos cynomolgus inyectados cuatro veces (una inyección/semana) con 0,5 o 1,5 mg/kg/semana de la SEQ ID 3 y 19.

Descripción detallada de la invención

A continuación se describen diferentes elementos de la invención bajo títulos separados. Se entiende que una modalidad de un elemento puede combinarse con modalidades de los otros elementos para llegar a un compuesto de la invención (por ejemplo, como se ilustra en las figuras 12 y 13)

El oligómero (región A)

El término "oligómero" u "oligonucleótido" en el contexto de la presente invención, se refiere a una molécula formada por el enlace covalente de dos o más nucleótidos (*es decir*, un oligonucleótido). En la presente descripción, un solo nucleótido (unidad) también puede denominarse un monómero o unidad. En algunas modalidades, los términos "nucleósido",

"nucleótido", "unidad" y "monómero" se usan indistintamente. Se reconocerá que cuando se hace referencia a una secuencia de nucleótidos o monómeros, a lo que se hace referencia es a la secuencia de bases, tal como A, T, G, C o U.

5 El oligómero de la invención es un gápmo de LNA de entre 16 - 20 nucleótidos de longitud y comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31.

Se describen oligómeros que comprenden una secuencia contigua seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 26, 27, 28, 29 y 44.

10 El oligómero o conjugado de la invención se dirige a PCSK9, y como tal es capaz de regular negativamente la expresión o inhibir PCSK9, tal como PCSK9 en un ser humano o en una célula que expresa PCSK9.

15 Se describe que los enlaces internucleosídicos de una secuencia contigua de 10 - 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 33 o 34 o 45 pueden ser enlaces fosforotioato.

En algunas modalidades, el oligómero de la invención comprende o consiste en una secuencia contigua seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO 2 y 3.

20 En algunas modalidades, el oligómero comprende 10 - 16 nucleósidos unidos por fosforotioato.

En algunas modalidades, el oligómero de la invención es un gápmo de LNA que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31, en donde la secuencia contigua comprende análogos nucleotídicos. En una modalidad, el oligómero de la invención comprende análogos nucleotídicos que mejoran la afinidad.

25 En algunas modalidades, los análogos nucleotídicos son nucleótidos modificados con azúcar, tales como nucleótidos modificados con azúcar seleccionados de forma independiente o de forma dependiente del grupo que consiste en: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN y unidades de 2'-fluoro-ADN.

30 El oligómero de la invención es un oligonucleótido de gápmo de LNA.

En algunas modalidades, el gápmo de LNA comprende un ala en cada lado (5' y 3') de 2 a 4 análogos nucleotídicos, preferentemente análogos de LNA.

35 En algunas modalidades, el oligómero de la invención puede comprender opcionalmente 1 - 6 nucleótidos adicionales, que pueden formar o comprender una región de nucleótidos bioescindible, tal como un enlazador de nucleótidos fosfato. Adecuadamente, la región de nucleótidos bioescindible está formada por un tramo corto (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5 o 6) de nucleótidos que son fisiológicamente lábiles. Esto puede lograrse mediante el uso de enlaces fosfodiéster con nucleósidos de ADN/ARN, o si puede mantenerse la labilidad fisiológica, puede usarse otro nucleósido. La labilidad fisiológica puede medirse mediante el uso de un extracto de hígado, como se ilustra en el ejemplo 6.

40 El oligómero de la invención comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31 (una primera región, o región A). El oligómero de la invención puede comprender una región de nucleótidos adicional. En algunas modalidades, la región de nucleótidos adicional comprende una región de nucleótidos bioescindible, tal como una secuencia de nucleótido fosfato (una segunda región, región B), que puede unir covalentemente la región A a una porción no nucleotídica, tal como un grupo de conjugado, (una tercera región, o región C). En algunas modalidades la secuencia nucleotídica contigua del oligómero de la invención (región A) está unida covalentemente de manera directa a la región C. En algunas modalidades la región C es bioescindible.

50 El oligómero consiste en o comprende una secuencia nucleotídica contigua de 16 - 20, tal como 16, 17, 18, 19, 20, 21, nucleótidos de longitud, tal como 16 nucleótidos de longitud, tal como 16 nucleótidos de longitud. Por lo tanto, el oligómero puede referirse a la longitud combinada de la región A y la región B, por ejemplo, (Región A 16nt) y la región B (1 - 6nt).

55 En diversas modalidades, el compuesto de la invención no comprende ARN (unidades). En algunas modalidades, el compuesto de acuerdo con la invención, la primera región, o las regiones primera y segunda juntas (por ejemplo, como una secuencia contigua única), es una molécula lineal o se sintetiza como una molécula lineal. Por lo tanto, el oligómero puede ser una molécula monocatenaria. En algunas modalidades, el oligómero no comprende regiones cortas de, por ejemplo, al menos 3, 4 o 5 nucleótidos contiguos, que son complementarios a regiones equivalentes dentro del mismo oligómero (*es decir*, dúplex). El oligómero, en algunas modalidades, puede no ser (esencialmente) bicatenario. El oligómero de la invención no es un ARNip.

60 Secuencias oligoméricas

La siguiente tabla describe oligómeros y conjugados de oligómeros y secuencias diana de PCSK9

65

ES 2 770 667 T3

Tabla 1

SEQ ID	Secuencia	PO	Col-C6	GalNAc	Posición en el gen de PCSK9 SEQ ID NO 44
5	1	TGctacaaaacCCA			3643-3656
	2	AATgctacaaaaCCCA			3643-3658
	3	AATgctacaaaacCCA			3643-3658
10	4	GCtgtgtgagcttGG			3251-3265
	5	TGctgtgtgagctTGG			3251-3266
	6	TGCtgtgtgagctTGG			3251-3266
15	7	TCCtggctctgttTCC			3373-3388
	8	TCCtggctctgttCC			3373-3388
	9	TGctacaaaacCCA	si	si	3643-3656
20	10	AATgctacaaaaCCCA	si	si	3643-3658
	11	AATgctacaaaacCCA	si	si	3643-3658
	12	GCtgtgtgagcttGG	si	si	3251-3265
25	13	TGctgtgtgagctTGG	si	si	3251-3266
	14	TGCtgtgtgagctTGG	si	si	3251-3266
	15	TCCtggctctgttTCC	si	si	3373-3388
	16	TCCtggctctgttCC	si	si	3373-3388
30	17	TGctacaaaacCCA		si	3643-3656
	18	AATgctacaaaaCCCA		si	3643-3658
	19	AATgctacaaaacCCA		si	3643-3658
35	20	GCtgtgtgagcttGG		si	3251-3265
	21	TGctgtgtgagctTGG		si	3251-3266
	22	TGCtgtgtgagctTGG		si	3251-3266
40	23	TCCtggctctgttTCC		si	3373-3388
	24	TCCtggctctgttCC		si	3373-3388
	40	GTctgtggaaGCG			1005-1017
45	41	GTctgtggaaGCG		si	1005-1017
	42	GTctgtggaaGCG	si	si	1005-1017
	43	GTctgtggaaGCG	si	si	1005-1017
50	25	tgctacaaaaccca			3643-3656
	26	aatgctacaaaaccca			3643-3658
	27	gctgtgtgagcttgg			3251-3265
55	28	tgctgtgtgagcttgg			3251-3266
	29	tcctggctctgttcc			3373-3388
	44	gtctgtggaagcg			1005-1017
60	30	UGGGUUUUGUAGC A			3643-3656
	31	UGGGUUUUGUAGC AUU			3643-3658
65	32	CCAAGCUCACACA GC			3251-3265

## ES 2 770 667 T3

33	CCAAGCUCACACA GCA				3251-3266
34	GGAACACAGACCA GGA				3373-3388
45	CGCUUCCACAGAC				1005-1017

La SEQ ID NO 25 - 29 y 44 son motivos de secuencia de nucleobases.

Las SEQ ID NO 30 - 34 y 45 son las secuencias diana de ARN presentes en el ARNm de PCSK9 humano.

La SEQ ID NO 1 es SPC5001.

Las SEQ ID NO 1 - 24 y 40 a 43 son oligómeros que comprenden análogos nucleotídicos tales como oligómeros de gápmero de LNA, donde las letras minúsculas son unidades de ADN (nucleósido/nucleótido) donde las letras mayúsculas son unidades de LNA,

En algunas modalidades todos los LNA C son 5-metil citosina. En algunas modalidades todas las unidades de LNA son beta-D-oxi LNA. En algunas modalidades los enlaces internucleosídicos entre los nucleósidos de las SEQ ID NO 1 - 24 y 40 a 43 son todos enlaces fosforotioato.

Las SEQ ID NO 9 - 16 y 41 a 43 comprenden el oligómero (como se indica por la SEQ ID) así como un conjugado de colesterol que puede estar unido covalentemente al extremo del oligómero 5' o 3' del oligómero, opcionalmente a través de un enlazador bioescindible, tal como un enlazador de nucleósido fosfato. En algunas modalidades, el conjugado de colesterol está unido al extremo 5' del oligómero.

Las SEQ ID NO 17 - 24 comprenden el oligómero (como se indica por la SEQ ID) así como un conjugado de GalNAc que puede estar unido covalentemente al extremo del oligómero 5' o 3' del oligómero, opcionalmente a través de un enlazador bioescindible, tal como un enlazador de nucleósido fosfato o enlazador peptídico escindible. En algunas modalidades, el conjugado de GalNAc está unido en el extremo 5' del oligómero.

Los oligómeros y conjugados específicos usados en la presente descripción se ilustran en la Figura 3 (oligómeros), Figura 4 (conjugados de colesterol), Figura 5 (conjugados de GalNAc). Otros ejemplos de conjugados que pueden usarse con el oligómero de la invención se ilustran en las Figuras 1 y 2 y se describen en la sección Porciones de conjugado de GalNAc.

La Tabla 2 proporciona combinaciones específicas de oligómero y conjugados.

Tabla 2: Combinaciones de oligómeros/conjugado.

SEQ ID	Número de conjugado (ver la figura 1)							
	Conj1	Conj2	Conj3	Conj4	Conj1a	Conj2a	Conj3a	Conj4a
2	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
3	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18
4	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19
5	C30	C31	C32	C33	C34	C35	C36	C37
6	C40	C41	C42	C43	C44	C45	C46	C47
7	C50	C51	C52	C53	C54	C55	C56	C57
8	C60	C61	C62	C63	C64	C65	C66	C67

SEQ ID	Número de conjugado (ver la figura 2)			
	Conj5	Conj6	Conj5a	Conj6a
2	C9	C10	C70	C71
3	C19	C20	C72	C73
4	C20	C21	C74	C75
5	C38	C39	C76	C77
6	C48	C49	C78	C79
7	C58	C59	C80	C81
8	C68	C69	C82	C83

Todas estas combinaciones pueden visualizarse al sustituir la línea ondulada en la Figura 1 o 2 con la secuencia del oligómero. La Figura 5 muestra la combinación de Conj2a con las SEQ ID NO indicadas anteriormente. Las Figuras 5A y 5B son dos ejemplos detallados de los compuestos en la figura 5. Debe notarse que un enlazador bioescindible (B) puede estar presente o no entre la porción de conjugado (C) y el oligómero (A). Para el Conj1 - 4 y 1a - 4a, el conjugado de GalNAc en sí mismo es bioescindible, utilizando un enlazador peptídico en la agrupación de GalNAc, y como tal puede usarse o no un enlazador bioescindible adicional (B). Sin embargo, los datos preliminares indican la inclusión de un enlazador bioescindible (B), tal como los enlazadores de nucleótidos fosfato descritos en la presente descripción puede mejorar la actividad de tales conjugados de oligómero con agrupaciones de GalNAc. La Figura 4 muestra la combinación de Conj5a con las SEQ ID NO indicadas anteriormente con un enlazador bioescindible (B) compuesto por dos monómeros de ADN C y A unidos con un enlace fosfodiéster. Para su uso con el Conj 5 y Conj 6, el uso de un enlazador bioescindible mejora en gran medida la actividad del compuesto y se recomienda la inclusión de un enlazador bioescindible (B), tales como los enlazadores de nucleótidos fosfato descritos en la presente descripción.

Las expresiones "que corresponde a" y "corresponde a" se refieren a la comparación entre la secuencia nucleotídica del oligómero (*es decir*, la secuencia de nucleobases o de bases) o la secuencia nucleotídica contigua (una primera región/región A) y el complemento inverso de la diana de ácido nucleico, o subregión de esta (por ejemplo, SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 o 45). Los análogos nucleotídicos se comparan directamente con sus nucleótidos equivalentes o correspondientes. En una modalidad preferida, los oligómeros (o la primera región de estos) son complementarios a la región diana o subregión de esta (por ejemplo, SEQ ID NO 31, 32, 33, 34 o 45), tal como completamente complementarios.

Las expresiones "complemento inverso", "complementario inverso" y "complementariedad inversa" como se usan en la presente descripción son intercambiables con los términos "complemento", "complementario" y "complementariedad".

El término "complementario" significa que dos secuencias son complementarias cuando la secuencia de una puede unirse a la secuencia de la otra en un sentido antiparalelo en donde el extremo 3' de cada secuencia se une al extremo 5' de la otra secuencia y cada A, T(U), G y C de una secuencia se alinean con una T(U), A, C y G, respectivamente, de la otra secuencia. Normalmente, la secuencia complementaria del oligonucleótido tiene al menos 90 %, preferentemente 95 %, con la máxima preferencia 100 %, de complementariedad con una secuencia definida.

Las expresiones "análogo nucleotídico correspondiente" y "nucleótido correspondiente" pretenden indicar que el nucleótido en el análogo nucleotídico y el nucleótido de origen natural son idénticos. Por ejemplo, cuando la unidad de 2-desoxirribosa del nucleótido está unida a una adenina, el "análogo nucleotídico correspondiente" contiene una unidad pentosa (diferente de la 2-desoxirribosa) unida a una adenina.

El término "nucleobase" se refiere a la porción de base de un nucleótido y cubre tanto las variantes de origen natural como las de origen no natural. Por lo tanto, "nucleobase" cubre no solo los heterociclos de purina y pirimidina conocidos, sino también los análogos heterocíclicos y tautómeros de estos. Se reconocerá que los nucleósidos de ADN o ARN de la región B pueden tener una(s) nucleobase(s) de origen natural y/o de origen no natural.

Los ejemplos de nucleobases incluyen, pero no se limitan a, adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, xantina, hipoxantina, 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina. En algunas modalidades, las nucleobases pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, timidina, uracilo, 5-metilcitosina. En algunas modalidades las nucleobases pueden seleccionarse independientemente del grupo que consiste en adenina, guanina, citosina, timidina y 5-metilcitosina.

En algunas modalidades, al menos una de las nucleobases presentes en el oligómero es una nucleobase modificada seleccionada del grupo que consiste en 5-metilcitosina, isocitosina, pseudoisocitosina, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina y 2-cloro-6-aminopurina.

La diana

Adecuadamente, el oligómero de la invención es capaz de modular la expresión del gen de PCSK9. Preferentemente, el oligómero es capaz de regular negativamente la expresión del gen de PCSK9. Al respecto, el oligómero de la invención puede afectar la expresión de PCSK9, típicamente en un mamífero tal como una célula humana, tal como una célula hepática. En algunas modalidades, los oligómeros de la invención se unen al ácido nucleico diana y el efecto sobre la expresión es al menos 10 % o 20 % de reducción en comparación con el nivel de expresión normal (por ejemplo, el nivel de expresión de una célula, animal o ser humano tratado con solución salina), con mayor preferencia al menos un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de inhibición en comparación con el nivel de expresión normal. En algunas modalidades, tal modulación se observa cuando se usa una concentración entre 0,04 y 25 nM, tal como entre 0,8 y 20 nM del compuesto de la invención. En algunas modalidades, tal modulación se observa cuando se usa una concentración entre 0,01 y 15 mg/kg, tal como entre 0,05 y 10 mg/kg, tal como entre 0,1 y 7,5 mg/kg, tal como entre 0,25 y 5 mg/kg, tal como de 0,5 y 2,5 mg/kg del compuesto de la invención. En la misma modalidad o en una modalidad diferente, la inhibición de la expresión es menos del 100 %, tal como menos del 98 % de inhibición, menos del 95 % de inhibición, menos del 90 % de inhibición, menos del 80 % de inhibición, tal como menos del 70 % de inhibición. La modulación del nivel de expresión puede determinarse midiendo los niveles de proteína, por ejemplo, mediante métodos tales como SDS-PAGE seguido de

5 transferencia Western mediante el uso de anticuerpos adecuados generados contra la proteína diana. Alternativamente, la modulación de los niveles de expresión puede determinarse midiendo los niveles de ARNm, *por ejemplo*, mediante transferencia Northern o RT-PCR cuantitativa. Cuando se mide a través de los niveles de ARNm, el nivel de regulación negativa cuando se usa una dosificación apropiada, tal como una concentración entre 0,04 y 25 nM, tal como entre 0,8 y 20 nM, está, en algunas modalidades, típicamente a un nivel de entre 10-20 % de los niveles normales en ausencia del compuesto de la invención.

10 La invención proporciona, por lo tanto, un método *in vitro* de regulación negativa o inhibición de la expresión de la proteína PCSK9 y/o ARNm en una célula que expresa la proteína PCSK9 y/o el ARNm, dicho método que comprende administrar el oligómero o conjugado de acuerdo con la invención a dicha célula para la regulación negativa o la inhibición de la expresión de la proteína PCSK9 y/o el ARNm en dicha célula. Adecuadamente, la célula es una célula de mamífero tal como una célula humana.

15 El término "ácido nucleico diana", como se usa en la presente descripción, se refiere al ADN o ARN que codifica el polipéptido de PCSK9 de mamífero, tal como PCSK9 humano, tal como el número de acceso de NCBI NM\_174936 SEQ ID NO: 46. Los ácidos nucleicos que codifican PCSK9 o las variantes de origen natural de estos, y los ácidos nucleicos de ARN derivados de estos, preferentemente ARNm, tal como pre-ARNm, aunque preferentemente ARNm maduro. En algunas modalidades, por ejemplo, cuando se usa en investigación o diagnóstico el "ácido nucleico diana" puede ser un ADNc o un oligonucleótido sintético derivado de las dianas de ácido nucleico de ADN o ARN anteriores. El oligómero de acuerdo con la invención es preferentemente capaz de hibridarse al ácido nucleico diana. Se reconocerá que la SEQ ID NO: 46 es una secuencia de ADNc y, como tal, corresponde a la secuencia diana de ARNm maduro, aunque el uracilo se reemplaza por timidina en las secuencias de ADNc.

25 El término "variante de origen natural de este" se refiere a variantes de la secuencia de ácido nucleico del polipéptido de PCSK9 que existen naturalmente dentro del grupo taxonómico definido, tal como mamífero, tal como ratón, mono y preferentemente humano. Típicamente, cuando se hace referencia a "variantes de origen natural" de un polinucleótido el término también puede abarcar cualquier variante alélica del ADN genómico que codifica PCSK9 que se encuentra en el cromosoma 4, en 4 C7 por translocación o duplicación cromosómica, y el ARN, tal como el ARNm derivado del mismo. Las "variantes de origen natural" también pueden incluir variantes derivadas del corte y empalme alternativo del ARNm de PCSK9. Cuando se hace referencia a una secuencia de polipéptidos específica, por ejemplo, el término también incluye formas de origen natural de la proteína que, por lo tanto, pueden procesarse, por ejemplo, mediante modificaciones co o postraduccionales, tales como escisión de péptido señal, escisión proteolítica, glicosilación, etc.

35 Se describen oligómeros (o una porción de nucleótidos contigua de estos) seleccionados de, o que comprenden, una de las secuencias seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 28 o 29 o 44, o una subsecuencia de al menos 10 nucleótidos contiguos de estos, en donde dicho oligómero (o porción de nucleótidos contigua de este) puede comprender opcionalmente una, dos o tres no coincidencias en comparación con la secuencia.

40 La secuencia diana del oligómero de la presente invención comprende o consiste en la SEQ ID NO 31.

45 Sin embargo, se reconoce que, en algunas modalidades la secuencia nucleotídica del oligómero puede comprender nucleótidos 5' o 3' adicionales, tales como, independientemente, 1, 2, 3, 4, 5 o 6 nucleótidos adicionales 5' y/o 3', que no son complementarios a la secuencia diana - tales oligonucleótidos no complementarios pueden formar la región B. Al respecto, el oligómero de la invención puede, en algunas modalidades, comprender una secuencia nucleotídica contigua que está flanqueada 5' y/o 3' por nucleótidos adicionales. En algunas modalidades los nucleótidos 5' o 3' adicionales son nucleótidos de origen natural, tal como ADN o ARN. En algunas modalidades, los nucleótidos 5' o 3' adicionales pueden representar la región D como se hace referencia en el contexto de oligómeros gámpmero en la presente descripción.

50 Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 27, o una subsecuencia de al menos 10 o 12 nucleobases de esta.

55 Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 28, o una subsecuencia de al menos 10 o 12 nucleobases de esta. Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 5 o 6. Se describe un conjugado oligomérico que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 13 o 14 o 21 o 22.

60 Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 29, o una subsecuencia de al menos 10 o 12 nucleobases de esta. Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 7 o 8. En otra modalidad preferida el conjugado oligomérico de acuerdo con la invención consiste en o comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 15 o 16 o 23 o 24.

65 Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 44, o una subsecuencia de al menos 10 o 12 nucleobases de esta. Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 40. Se describe un conjugado oligomérico que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 41, 42 o 43.

Se describe un oligómero que consiste en o que comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO:26. En una modalidad preferida, el oligómero de acuerdo con la invención consiste en o comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 2 o 3. En otra modalidad preferida, el conjugado oligomérico de acuerdo con la invención consiste en o comprende una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEQ ID NO: 10 o 11 o 18 o 19.

5

Longitud

Los oligómeros pueden comprender o consistir en una secuencia nucleotídica contigua de un total de 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22 nucleótidos contiguos de longitud. Las longitudes pueden incluir la región A o las regiones A y B, por ejemplo.

10

En algunas modalidades, los oligómeros comprenden o consisten en una secuencia nucleotídica contigua de un total de entre 16 - 22, tal como 16 nucleótidos contiguos de longitud. Preferentemente, el oligómero de la región A comprende o consiste en una secuencia nucleotídica contigua de 16 nucleótidos contiguos de longitud.

15

En algunas modalidades, el oligómero de acuerdo con la invención consiste en no más de 22 nucleótidos, tal como no más de 20 nucleótidos, tal como no más de 18 nucleótidos, tales como 16 o 17 nucleótidos. En algunas modalidades, el oligómero de la invención comprende menos de 20 nucleótidos.

Análogos nucleotídicos

20

El término "nucleótido" como se usa en la presente descripción, se refiere a un glucósido que comprende una porción de azúcar, una porción de base y un grupo unido covalentemente, tal como un grupo fosfato o fosforotioato de enlace internucleotídico, y cubre ambos nucleótidos de origen natural, tal como ADN o ARN, y nucleótidos de origen no natural que comprenden porciones de azúcar y/o de bases modificadas, que también se denominan "análogos nucleotídicos" en la presente descripción. En la presente descripción, un solo nucleótido (unidad) también puede denominarse un monómero o unidad de ácido nucleico.

25

En el campo de la bioquímica, el término "nucleósido" se usa comúnmente para referirse a un glucósido que comprende una porción de azúcar y una porción de base. El enlace covalente entre dos nucleósidos puede denominarse un enlace internucleósidos. Alternativamente, el término enlace internucleótidos puede usarse para caracterizar el enlace entre los nucleótidos del oligómero.

30

Como reconocería un experto en la técnica, el nucleótido 5' de un oligonucleótido no comprende un grupo de enlace internucleótidos 5', aunque puede comprender o no un grupo terminal 5', tal como un fosfodiéster o fosforotioato adecuado para conjugar un enlazador (B o Y o una porción de conjugado).

35

Los nucleótidos de origen no natural incluyen nucleótidos que tienen porciones de azúcar modificadas, tales como los nucleótidos bicíclicos o nucleótidos modificados en 2', tales como nucleótidos sustituidos en 2'.

40

Los "análogos nucleotídicos" son variantes de nucleótidos de origen natural, tales como nucleótidos de ADN o ARN, en virtud de las modificaciones en las porciones de azúcar y/o base. En principio, los análogos podrían ser simplemente "silenciosos" o "equivalentes" con respecto a los nucleótidos de origen natural en el contexto del oligonucleótido, es decir, no tienen ningún efecto funcional sobre la forma en que el oligonucleótido funciona para inhibir la expresión del gen diana. Sin embargo, tales análogos "equivalentes" pueden ser útiles si, por ejemplo, son más fáciles o más baratos de fabricar, o son más estables a las condiciones de almacenamiento o de fabricación, o representan una etiqueta o marcador. Sin embargo, preferentemente, los análogos tendrán un efecto funcional sobre la forma en que el oligómero trabaja para inhibir la expresión; por ejemplo, produciendo una mayor afinidad de unión (mejora de la afinidad) a la diana y/o una mayor resistencia a las nucleasas intracelulares y/o una mayor facilidad de transporte en la célula. Los ejemplos específicos de análogos nucleosídicos son descritos por, *por ejemplo*, Freier & Altman; Nucl. Acid Res., 1997, 25, 4429-4443 y Uhlmann; Curr. Opinion in Drug Development, 2000, 3(2), 293-213, y en el Esquema 1:

45

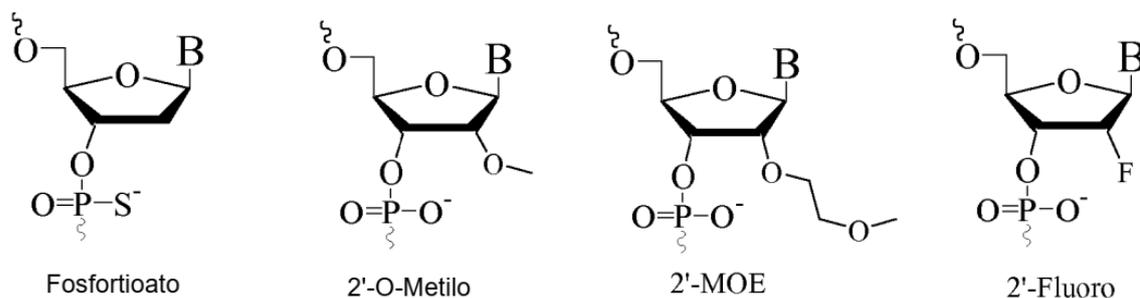
50

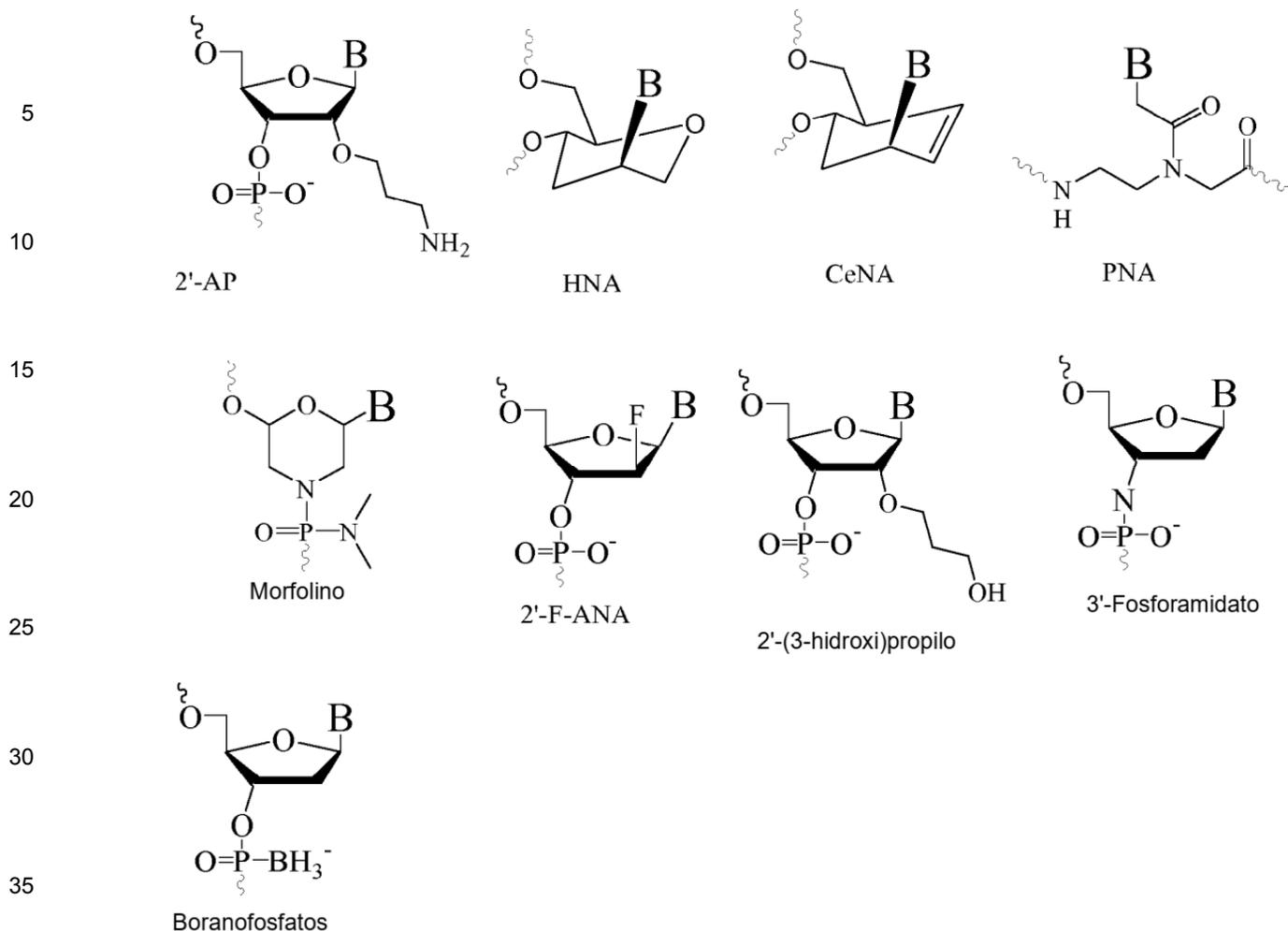
Esquema 1

55

60

65





40 Se describen oligómeros que comprenden o consisten en una secuencia simple de nucleótidos de origen natural - preferentemente 2'-desoxinucleótidos (denominados aquí generalmente "ADN"), pero también posiblemente ribonucleótidos (denominados aquí generalmente "ARN"), o una combinación de tales nucleótidos de origen natural y uno o más nucleótidos de origen no natural, es *decir*, análogos nucleotídicos. Tales análogos nucleotídicos pueden mejorar adecuadamente la afinidad del oligómero por la secuencia diana. Los ejemplos de análogos nucleotídicos adecuados y preferidos se proporcionan en el documento WO2007/031091 o se hacen referencia en el mismo.

45 La incorporación de análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad en el oligómero, tales como LNA o azúcares sustituidos en 2', puede permitir que se reduzca el tamaño del oligómero de unión específica, y también puede reducir el límite superior al tamaño del oligómero antes que tenga lugar una unión no específica o aberrante.

50 En unas modalidades el oligómero de la invención comprende al menos 2 análogos nucleotídicos. En algunas modalidades, el oligómero comprende de 3-8 análogos nucleotídicos, por ejemplo, 6 o 7 análogos nucleotídicos.

55 Los ejemplos de análogos nucleotídicos incluyen la modificación de la porción de azúcar para proporcionar un grupo sustituyente 2' o para producir una estructura bicíclica que mejore la afinidad de unión y también puede proporcionar una mayor resistencia a nucleasas.

60 En algunas modalidades, los análogos nucleotídicos presentes dentro de un oligómero antisentido de la presente invención (tal como en las regiones X' e Y' mencionadas en la sección "Diseño de gámpero") se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, 2'-O-alkil-ADN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de LNA, unidades de ácido arábico nucleico (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, unidades de INA (ácido nucleico intercalante -Christensen, 2002. Nucl. Ácidos Res. 2002 30: 4918-4925) y unidades de 2'MOE.

65 En algunas modalidades, los análogos nucleotídicos son 2'-O-metoxietil-ARN (2'MOE), monómeros de 2'-fluoro-ADN o análogos nucleotídicos de LNA, y como tal un oligonucleótido antisentido de la presente invención puede comprender análogos nucleotídicos que se seleccionan independientemente de estos tres tipos de análogos, o puede comprender solo un tipo de análogo seleccionado de los tres tipos. En algunas modalidades al menos uno de dichos análogos

nucleotídicos es 2'-MOE-ARN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos 2'-MOE-ARN. En algunas modalidades, al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es 2'-fluoro-ADN, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 unidades de nucleótidos 2'-fluoro-ADN.

5 Un análogo nucleotídico preferido es LNA, tal como oxi-LNA (tal como beta-D-oxi-LNA y alfa-L-oxi-LNA), y/o amino-LNA (tal como beta-D-amino-LNA y alfa-L-amino-LNA) y/o tio-LNA (tal como beta-D-tio-LNA y alfa-L-tio-LNA) y/o ENA (tal como beta-D-ENA y alfa-L-ENA). Lo más preferido es beta-D-oxi-LNA.

10 En algunas modalidades, solo existe uno de los tipos anteriores de análogos nucleotídicos, es *decir* LNA, presente en un oligonucleótido antisentido de la presente invención, o una secuencia nucleotídica contigua de este.

15 El oligonucleótido antisentido de la presente invención comprende al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de LNA, tal como de 3 - 7 o 4 a 8 unidades de LNA. Al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es un ácido nucleico bloqueado (LNA); por ejemplo, al menos 3 o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7 u 8, de los análogos nucleotídicos pueden ser LNA. En algunas modalidades todos los análogos nucleotídicos pueden ser LNA.

20 En algunas modalidades, un oligonucleótido antisentido de la presente invención puede comprender tanto análogos nucleotídicos (preferentemente LNA) como unidades de ADN. Preferentemente, el total combinado de análogos nucleotídicos (preferentemente LNA) y unidades de ADN es preferentemente 10-20, tal como 10 - 18, incluso con mayor preferencia 12-16. En algunas modalidades, la secuencia nucleotídica de un oligonucleótido antisentido de la presente invención, tal como la secuencia nucleotídica contigua, consiste en al menos un análogo nucleotídico (LNA) y las unidades de nucleótidos restantes son unidades de ADN. En algunas modalidades, un oligonucleótido antisentido de la presente invención comprende solo análogos nucleotídicos de LNA y nucleótidos de origen natural (tales como ARN o ADN, con la máxima preferencia nucleótidos de ADN), opcionalmente con enlaces internucleotídicos modificados tales como fosfortioato.

25 Se reconocerá que cuando se hace referencia a un motivo de secuencia nucleotídica o secuencia nucleotídica preferida, que consiste solo en nucleótidos, los oligómeros de la invención que se definen por esa secuencia pueden comprender un análogo nucleotídico correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como las unidades de LNA u otros análogos nucleotídicos, que aumentan la estabilidad del dúplex/ $T_m$  del oligómero/dúplex diana (es *decir*, análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad).

30 Ensayo de  $T_m$ : El oligonucleótido: Los dúplex diana de oligonucleótido y ARN (PO) se diluyen a 3 mM en 500 ml de agua libre de ARNasa y se mezclan con 500 ml de tampón  $T_m$  2x (NaCl 200 mM, EDTA 0,2 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 7,0). La solución se calienta a 95 °C durante 3 minutos y después se deja hibridar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las temperaturas de fusión de dúplex ( $T_m$ ) se mide en un espectrofotómetro Lambda 40 UV/VIS equipado con un programador de temperatura Peltier PTP6 mediante el uso del software PE Templab (Perkin Elmer). La temperatura se aumenta de 20 °C a 95 °C y después se baja a 25 °C, registrando la absorción a 260 nm. El primer derivado y los máximos locales tanto de fusión como de la hibridación se usan para evaluar la  $T_m$  del dúplex.

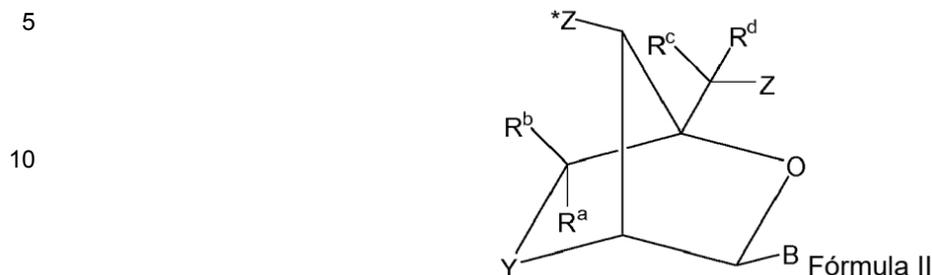
35 En algunas modalidades, cualquier no coincidencia entre la secuencia nucleotídica del oligómero y la secuencia diana se encuentra preferentemente en regiones fuera de los análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad, tales como la región Y' como se menciona en la sección "Diseño de gápmero, y/o en una posición con no modificado, tal como nucleótidos de ADN, en el oligonucleótido, y/o en regiones que están 5' o 3' a la secuencia de nucleótidos contigua.

#### LNA

40 El término "LNA" se refiere a un análogo nucleosídico bicíclico que comprende un puente entre la posición 2' y 4' en el anillo de ribosa (análogo nucleotídico bicíclico de 2' a 4'), y se conoce como "ácido nucleico bloqueado". ) LNA a veces se encuentra denominado en la bibliografía como BNA (ácido nucleico puenteado o ácido nucleico bicíclico) y los dos términos pueden usarse indistintamente. El término LNA puede referirse a un monómero de LNA o, cuando se usa en el contexto de un "oligonucleótido de LNA", LNA se refiere a un oligonucleótido que contiene uno o más de tales análogos nucleotídicos bicíclicos. En algunos aspectos, los análogos nucleosídicos bicíclicos son nucleótidos de LNA y, por lo tanto, estos términos pueden usarse indistintamente, y en tales modalidades, ambos se caracterizan por la presencia de un grupo enlazador (tal como un puente) entre C2' y C4' de anillo de azúcar de ribosa.

45 En algunas modalidades, un oligonucleótido antisentido de la presente invención puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA como una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA, 5'-metil-LNA y/o ENA ya sea en las configuraciones beta-D o alfa-L o combinaciones de estas. En algunas modalidades, todas las unidades de citosina de LNA son 5'-metil-citosina. En algunas modalidades, al menos un análogo nucleosídico presente en la primera región (X') es un análogo nucleosídico bicíclico, tal como al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, (excepto los nucleósidos de ADN y/o ARN de la región Y') son análogos nucleosídicos modificados con azúcar, tales como los análogos nucleosídicos bicíclicos, tal como LNA, por ejemplo, beta-DX-LNA o alfa-LX-LNA (en donde X es oxi, amino o tio), u otros LNA descritos en la presente descripción que incluyen, pero no se limitan a, (R/S) cET, cMOE o 5'-Me-LNA.

En algunas modalidades, el LNA usado en los compuestos oligonucleotídicos de la invención tiene preferentemente la estructura de la fórmula general II:



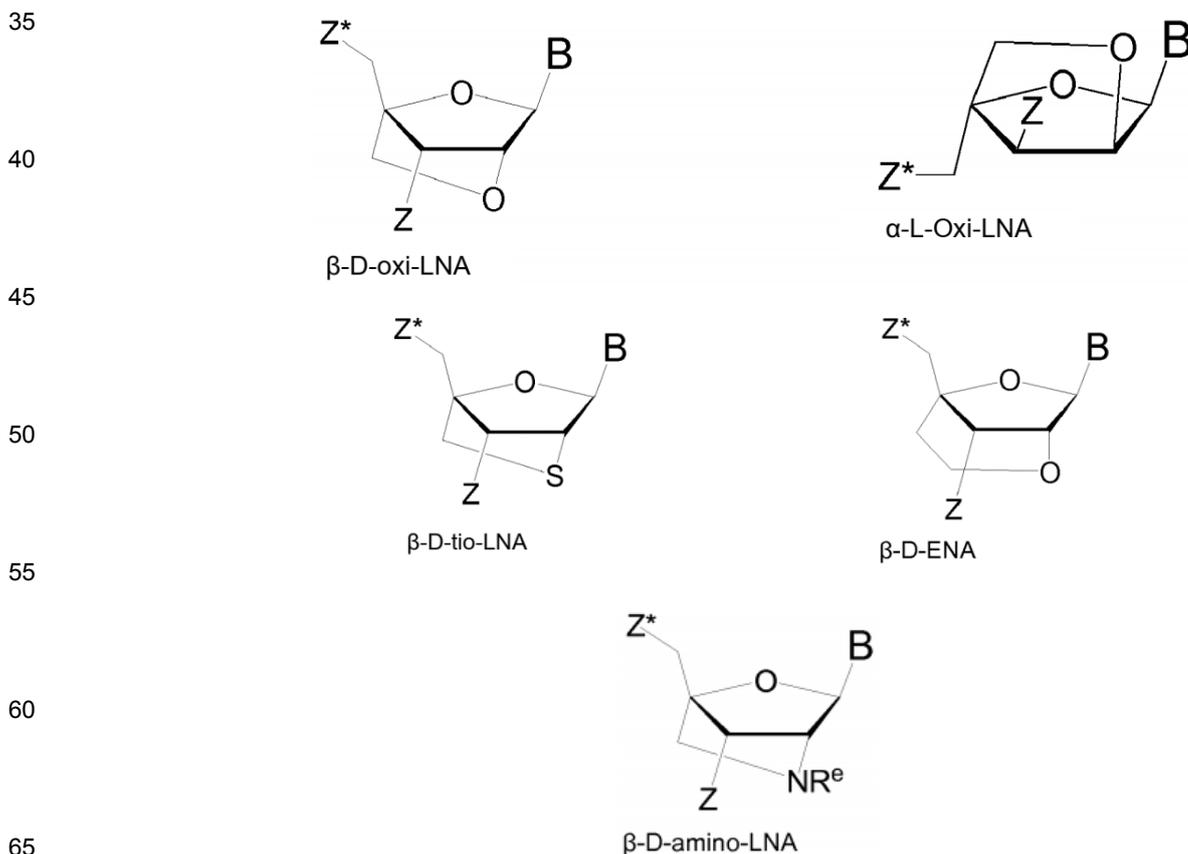
20

25

30

en donde Y se selecciona del grupo que consiste en -O-, -CH<sub>2</sub>O-, -S-, -NH-, N (R<sup>e</sup>) y/o -CH<sub>2</sub>-; Z y Z\* se seleccionan independientemente entre un enlace internucleótidos, R<sup>H</sup>, un grupo terminal o un grupo protector; B constituye una porción de base de nucleótidos natural o no natural (nucleobase), y R<sup>H</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>; R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> y R<sup>e</sup> opcionalmente se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C<sub>1-12</sub> opcionalmente sustituido, alqueno C<sub>2-12</sub> opcionalmente sustituido, alquino C<sub>2-12</sub> opcionalmente sustituido, hidroxilo, alcoxi C<sub>1-12</sub>, alcoxialquilo C<sub>2-12</sub>, alquenoiloxi C<sub>2-12</sub>, carboxilo, alcóxicarbonilo C<sub>1-12</sub>, alquilcarbonilo C<sub>1-12</sub>, formilo, arilo, ariloxicarbonilo, ariloxi, arilcarbonilo, heteroarilo, heteroariloxicarbonilo, heteroariloxi, heteroarilcarbonilo, amino, mono y di (alquilo C<sub>1-6</sub>)amino, carbamoilo, mono y di (alquilo C<sub>1-6</sub>)aminocarbonilo, amino-alquilo C<sub>1-6</sub>aminocarbonilo, mono y di (alquilo C<sub>1-6</sub>)amino-alquilo C<sub>1-6</sub>aminocarbonilo, alquilcarbonilamino C<sub>1-6</sub>, carbamido, alcanoiloxi C<sub>1-6</sub>, sulfono, alquilsulfoniloxi C<sub>1-6</sub>, nitro, azido, sulfanilo, alquiltio C<sub>1-6</sub>, halógeno, intercaladores de ADN, grupos fotoquímicamente activos, grupos termoquímicamente activos, grupos quelantes, grupos reporteros, y ligandos, donde arilo y heteroarilo pueden estar opcionalmente sustituidos y donde dos sustituyentes geminales R<sup>a</sup> y R<sup>b</sup> juntos pueden designar metileno opcionalmente sustituido (=CH<sub>2</sub>); y R<sup>H</sup> se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>. En algunas modalidades R<sup>a</sup>, R<sup>b</sup>, R<sup>c</sup>, R<sup>d</sup> y R<sup>e</sup> opcionalmente se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo C<sub>1-6</sub>, tal como metilo. Para todos los centros quirales, pueden encontrarse grupos asimétricos ya sea en orientación R o S, por ejemplo, dos isómeros estereoquímicos ilustrativos incluyen las isoformas beta-D y alfa-L, que pueden ilustrarse de la siguiente manera:

Las unidades de LNA ilustrativas específicas se muestran a continuación:



El término "tio-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior se selecciona de S o -CH<sub>2</sub>-S-. Tio-LNA puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

5 El término "amino-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior se selecciona de -N(H)-, N(R)-, CH<sub>2</sub>-N(H)- y -CH<sub>2</sub>-N(R)- donde R se selecciona de hidrógeno y alquilo C<sub>1-4</sub>. Amino-LNA puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

El término "oxi-LNA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior representa -O-. Oxi-LNA puede estar tanto en configuración beta-D como alfa-L.

10 El término "ENA" comprende un nucleótido bloqueado en el que Y en la fórmula general anterior es -CH<sub>2</sub>-O- (donde el átomo de oxígeno de -CH<sub>2</sub>-O- está unido a la posición 2' con respecto a la base B). R<sup>e</sup> es hidrógeno o metilo.

En algunas modalidades ilustrativas, LNA se selecciona de beta-D-oxi-LNA, alfa-L-oxi-LNA, beta-D-amino-LNA y beta-D-tio-LNA, en particular beta-D-oxi-LNA.

15 Como se usa en la presente descripción, "nucleósidos bicíclicos" se refiere a nucleósidos modificados que comprenden una porción de azúcar bicíclico. Los ejemplos de nucleósidos bicíclicos incluyen, sin limitación, nucleósidos que comprenden un puente entre los átomos del anillo ribosilo 4' y 2'. En algunas modalidades, los compuestos proporcionados en la presente descripción incluyen uno o más nucleósidos bicíclicos en donde el puente comprende un nucleósido bicíclico 4' a 2'. Los ejemplos de tales nucleósidos bicíclicos 4' a 2' incluyen, pero no se limitan a, una de las fórmulas: 4'-(CH<sub>2</sub>)-O-2'(LNA); 4'-(CH<sub>2</sub>)-S-2'; 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2' (ENA); 4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2' y 4'-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-O-2\*, y análogos de estos (ver, la patente de Estados Unidos 7,399,845, presentada el 15 de julio de 2008); 4'-C(CH<sub>3</sub>)(CH<sub>3</sub>)-O-2', y análogos de estos (ver, la solicitud internacional PCT publicada WO2009/006478, publicada el 8 de enero de 2009); 4'-CH<sub>2</sub>-N(OCH<sub>3</sub>)-2', y análogos de estos (ver, la solicitud internacional PCT publicada WO2008/150729, publicada el 11 de diciembre de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-ON(CH<sub>3</sub>)-2' (ver, la solicitud de patente de Estados Unidos publicada US2004/0171570, publicada el 2 de septiembre de 2004); 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', en donde R es H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, o un grupo protector (ver, la patente de Estados Unidos 7,427,672, presentada el 23 de septiembre de 2008); 4'-CH<sub>2</sub>-C(H)(CH<sub>3</sub>)-2' (ver, Chattopadhyaya, y otros, J. Org. Chem., 2009, 74, 118-134); y 4'-CH<sub>2</sub>-C(=CH<sub>2</sub>)-2', y análogos de estos (ver, la solicitud internacional PCT publicada WO 2008/154401, publicada el 8 de diciembre de 2008). Ver también, por ejemplo: Singh y otros, Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin y otros, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh y otros, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava y otros, J. Am. Chem. Soc., 129(26) 8362-8379 (4 de julio de 2007); Elayadi y otros, Curr. Opinion Inven. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch y otros, Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Oram y otros, Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; patentes de Estados Unidos núms. U.S. 6,670,461, 7,053,207, 6,268,490, 6,770,748, 6,794,499, 7,034,133, 6,525,191, 7,399,845; solicitudes internacionales PCT publicadas WO 2004/106356, WO 94/14226, WO 2005/021570, y WO 2007/134181; publicaciones de patente de Estados Unidos núms. US2004/0171570, US2007/0287831, y US2008/0039618; y patentes de Estados Unidos núms. de serie 12/129,154, 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, y 61/099,844; y solicitudes internacionales PCT núms. PCT/US2008/064591, PCT/US2008/066154, y PCT/US2008/068922. Cada uno de los nucleósidos bicíclicos anteriores puede prepararse con una o más configuraciones estereoquímicas del azúcar que incluyen, por ejemplo, L-ribofuranosa y beta-D-ribofuranosa (ver la solicitud internacional PCT PCT DK98/00393, publicada el 25 de marzo de 1999 como WO 99/14226).

45 En algunas modalidades, los porciones de azúcar bicíclicos de los nucleósidos de LNA incluyen, pero no se limitan a, compuestos que tienen al menos un puente entre la posición 4' y la 2' de la porción de azúcar pentofuranosilo en donde tales puentes comprenden independientemente 1 o de 2 a 4 grupos unidos seleccionados independientemente de -[C(R<sub>a</sub>XR<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -C(R<sub>a</sub>)=C(R<sub>b</sub>)-, -C(R<sub>a</sub>)=N-, -C(=NR<sub>a</sub>)-, -C(=O)-, -C(=S)-, -O-, -Si(R<sub>a</sub>)<sub>2</sub>-, -S(=O)<sub>x</sub>- y -N(R<sub>a</sub>)-; en donde: x es 0, 1 o 2; n es 1, 2, 3 o 4; cada R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> es, independientemente, H, un grupo protector, hidroxilo, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, arilo C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>, arilo C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> sustituido, radical heterociclo, radical heterociclo sustituido, heteroarilo, heteroarilo sustituido, radical alíclico C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub>, radical alíclico C<sub>5</sub>-C<sub>7</sub> sustituido, halógeno, OJ<sub>1</sub>, NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, SJ<sub>1</sub>, N<sub>3</sub>, COOJ<sub>1</sub>, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, CN, sulfonilo (S(=O)<sub>2</sub>-J<sub>1</sub>) o sulfoxilo (S(=O)-J<sub>1</sub>); y cada J<sub>1</sub> y J<sub>2</sub> es, independientemente, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquino C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, arilo C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub>, arilo C<sub>5</sub>-C<sub>20</sub> sustituido, acilo (C(=O)-H), acilo sustituido, un radical heterociclo, un radical heterociclo sustituido, aminoalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, aminoalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, o un grupo protector.

55 En algunas modalidades, el puente de una porción de azúcar bicíclico es, -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-, -[C(R<sub>a</sub>)(R<sub>b</sub>)]<sub>n</sub>-O-, -C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-N(R)-O- o, -C(R<sub>a</sub>R<sub>b</sub>)-O-N(R)-. En algunas modalidades, el puente es 4'-CH<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-2', 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2', 4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2', y 4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2', en donde cada R es, independientemente, H, un grupo protector, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>.

60 En algunas modalidades, los nucleósidos bicíclicos se definen adicionalmente por la configuración isomérica. Por ejemplo, un nucleósido que comprende un puente 4'-2' metileno-oxi, puede estar en la configuración α-L o en la configuración β-D. Anteriormente, los BNA α-L-metileno-oxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') se han incorporado en oligonucleótidos antisentido que mostraron actividad antisentido (Frieden y otros, Nucleic Acids Research, 2003, 21, 6365- 6372).

65

En algunas modalidades, los nucleósidos bicíclicos incluyen, pero no se limitan a, (A) a-L-Metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (B) beta -D-Metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, (C) Etilenoxi (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-2') BNA, (D) Aminooxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-N(R)-2') BNA, (E) Oxiamino (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-O-2') BNA, (F) Metil(metilenoxi) (4'-CH(CH<sub>3</sub>)-O-2') BNA, (G) metilen-tio (4'-CH<sub>2</sub>-S-2') BNA, (H) metilen- amino (4'-CH<sub>2</sub>-N(R)-2') BNA, (I) (4'-CH<sub>2</sub>-CH(CH<sub>3</sub>)-2') BNA metil carbocíclico y (J) (4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2') BNA propilen carbocíclico como se representa a continuación.

5

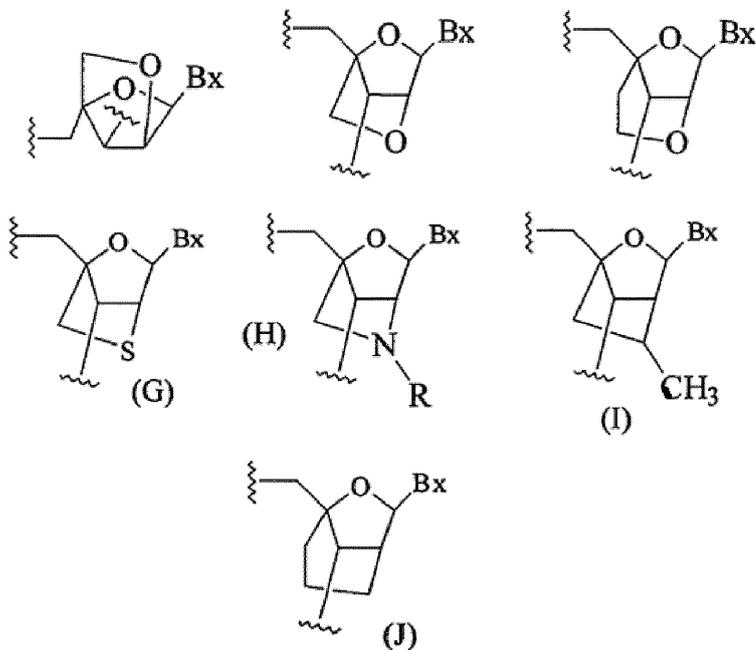
10

15

20

25

30

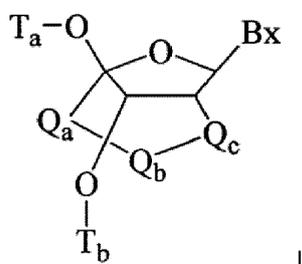


en donde Bx es la porción de base y R es, independientemente, H, un grupo protector o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub>.

En algunas modalidades, el nucleósido bicíclico se define por la Fórmula I:

35

40



en donde:

45

Bx es una porción de base heterocíclico;

-Q<sub>a</sub>-Q<sub>b</sub>-Q<sub>c</sub>- es -CH<sub>2</sub>-N(R<sub>c</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -C(=O)-N(R<sub>c</sub>)-CH<sub>2</sub>-, -CH<sub>2</sub>-O-N(R<sub>c</sub>)-, -CH<sub>2</sub>-N(R<sub>c</sub>)-O-, o -N(R<sub>c</sub>)-O-CH<sub>2</sub>;

50

R<sub>c</sub> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> o un grupo protector de amino; y

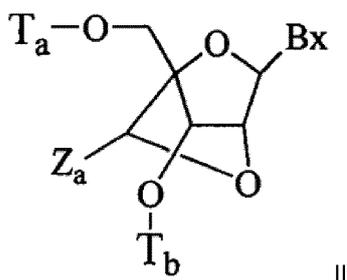
T<sub>a</sub> y T<sub>b</sub> son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una porción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte.

55

En algunas modalidades, el nucleósido bicíclico se define por la Fórmula II:

60

65



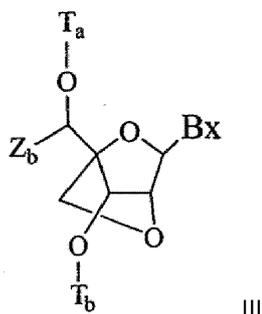
en donde:

Bx es una porción de base heterocíclico;

5  $T_a$  y  $T_b$  son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una porción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;  $Z_a$  es alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_2-C_6$ , alquinilo  $C_2-C_6$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido, alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido, acilo, acilo sustituido, amida sustituida, tior o tio sustituido.

10 En algunas modalidades, cada uno de las agrupaciones sustituidos está, independientemente, mono o poli sustituido con grupos sustituyentes seleccionados independientemente de halógeno, oxo, hidroxilo,  $OJ_c$ ,  $NJ_d$ ,  $SJ_c$ ,  $N_3$ ,  $OC(=X)J_c$ , y  $NJ_eC(=X)NJ_cJ_d$ , en donde cada  $J_cJ_d$ , y  $J_e$  es, independientemente, H, alquilo  $C_1-C_6$  o alquilo  $C_1-C_6$  sustituido y X es O o  $NJ_c$ .

15 En algunas modalidades, el nucleósido bicíclico se define por la Fórmula III:



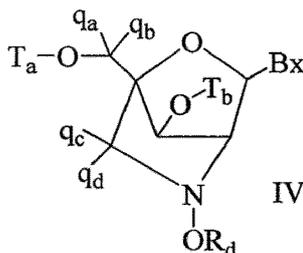
en donde:

30 Bx es una porción de base heterocíclico;

$T_a$  y  $T_b$  son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una porción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

35  $R_d$  es alquilo  $C_1-C_6$ , alquenilo  $C_2-C_6$ , alquinilo  $C_2-C_6$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido, alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido o acilo sustituido ( $C(=O)-$ ).

En algunas modalidades, el nucleósido bicíclico se define por la Fórmula IV:



en donde:

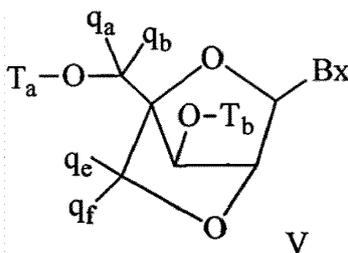
50 Bx es una porción de base heterocíclico;

$T_a$  y  $T_b$  son cada uno, independientemente H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una porción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte;

55  $R_d$  es alquilo  $C_1-C_6$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$ , alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido, alquinilo  $C_2-C_6$ , alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido; cada  $q_bq_c$  y  $q_d$  es, independientemente, H, halógeno, alquilo  $C_1-C_6$ , alquilo  $C_1-C_6$  sustituido, alquenilo  $C_2-C_6$ , alquenilo  $C_2-C_6$  sustituido, alquinilo  $C_2-C_6$  o alquinilo  $C_2-C_6$  sustituido, alcoxilo  $C_1-C_6$ , alcoxilo  $C_1-C_6$  sustituido, acilo, acilo sustituido, aminoalquilo  $C_1-C_6$  o aminoalquilo  $C_1-C_6$  sustituido;

60 En algunas modalidades, el nucleósido bicíclico se define por la Fórmula V:

65



5

10 en donde:

Bx es una porción de base heterocíclico;

15

T<sub>a</sub> y T<sub>b</sub> son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una porción de fósforo o una unión covalente a un medio de soporte; q<sub>a</sub>, q<sub>b</sub>, q<sub>c</sub> y q<sub>f</sub> son cada uno, independientemente, hidrógeno, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxi C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, OJ<sub>j</sub>, SJ<sub>j</sub>, SOJ<sub>j</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>j</sub>, NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>j</sub>, C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, C(=O)J<sub>j</sub>, O-C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub> o N(H)C(=S)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>; o q<sub>e</sub> y q<sub>f</sub> juntos son =C(q<sub>g</sub>)(q<sub>h</sub>); q<sub>g</sub> y q<sub>h</sub> son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido.

20

La síntesis y preparación de los metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') monómeros de BNA adenina, citosina, guanina, 5-metil-citosina, timina y uracilo, junto con su oligomerización, y se han descrito propiedades de reconocimiento de ácidos nucleicos (ver, por ejemplo, Koshkin y otros, Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630). Los BNA y la preparación de estos también se describen en los documentos WO 98/39352 y WO 99/14226.

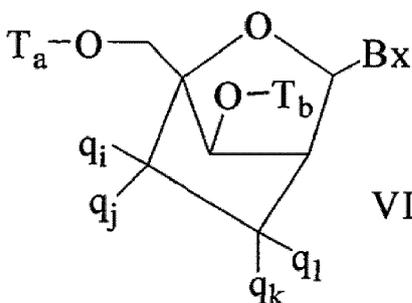
25

Se han preparado además análogos de metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, metilenoxi (4'-CH<sub>2</sub>-O-2') BNA, y 2'-tio- BNA {ver, por ejemplo, Kumar y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222}. También se ha descrito la preparación de análogos nucleosídicos bloqueados que comprenden dúplex de oligodesoxirribonucleótidos como sustratos para polimerasas de ácido nucleico (ver, por ejemplo, Wengel y otros, WO 99/14226). Además, la síntesis de 2'-amino-BNA, un nuevo análogo oligonucleotídico de alta afinidad restringido conformacionalmente, se ha descrito en la técnica (ver, por ejemplo, Singh y otros, J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039). Además, se han preparado 2'- amino- y 2'-metilamino-BNA y se ha informado previamente la estabilidad térmica de sus dúplex con cadenas complementarias de ARN y ADN.

30

En algunas modalidades, el nucleósido bicíclico está definido por la Fórmula VI:

35



40

45

en donde:

Bx es una porción de base heterocíclico;

50

T<sub>a</sub> y T<sub>b</sub> son cada uno, independientemente, H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado, un grupo de fósforo reactivo, una porción de fósforo, o una unión covalente a un medio de soporte; cada q<sub>j</sub>, q<sub>k</sub> y q<sub>l</sub> es, independientemente, H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub>, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, alcoxilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, alcoxilo C<sub>2</sub>-C<sub>12</sub> sustituido, OJ<sub>j</sub>, SJ<sub>j</sub>, SOJ<sub>j</sub>, SO<sub>2</sub>J<sub>j</sub>, NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N<sub>3</sub>, CN, C(=O)OJ<sub>j</sub>, C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, C(=O)J<sub>j</sub>, O-C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=NH)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, N(H)C(=O)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>, o (H)C(=S)NJ<sub>j</sub>J<sub>k</sub>; y q<sub>i</sub> y q<sub>l</sub> o q<sub>k</sub> juntos son =C(q<sub>g</sub>)(q<sub>h</sub>), en donde q<sub>g</sub> y q<sub>h</sub> son cada uno, independientemente, H, halógeno, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>, o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido.

55

Se han descrito un nucleósido carbocíclico bicíclico que tiene un puente 4'-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-2' y el análogo alquenilo, puente 4'-CH=CH-CH<sub>2</sub>-2', (ver, por ejemplo, Freier y otros, Nucleic Acids Research, 1997, 25 (22), 4429- 4443 y Albaek y otros, J. Org. Chem., 2006, 71, 7731-77 '40). También se han descrito la síntesis y preparación de nucleósidos bicíclicos carbocíclicos junto con su oligomerización y los estudios bioquímicos (ver, por ejemplo, Srivastava y otros, J. Am. Chem Soc. 2007, 129(26), 8362-8379).

60

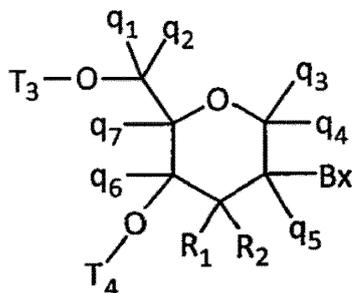
Como se usa en la presente descripción, "nucleósido bicíclico 4'-2'" o "nucleósido bicíclico 4' a 2'" se refiere a un nucleósido bicíclico que comprende un anillo de furanosa que comprende un puente que conecta el átomo de carbono 2' y el átomo de carbono 4'.

65

Como se usa en la presente descripción, "nucleósidos monocíclicos" se refiere a nucleósidos que comprenden porciones de azúcar modificados que no son porciones de azúcar bicíclicos. En algunas modalidades, la porción de azúcar, o análogo de la porción de azúcar, de un nucleósido puede modificarse o sustituirse en cualquier posición.

5 Como se usa en la presente descripción, "azúcar modificado en 2'" significa un azúcar de furanosilo modificado en la posición 2'. En algunas modalidades, tales modificaciones incluyen sustituyentes seleccionados de: un haluro, que incluye, pero no se limita a, alcoxi sustituido y no sustituido, tioalquilo sustituido y no sustituido, aminoalquilo sustituido y no sustituido, alquilo sustituido y no sustituido, alilo sustituido y no sustituido, y alquinilo sustituido y no sustituido. En algunas modalidades, las modificaciones 2' se seleccionan de sustituyentes que incluyen, pero no se limitan a:  $O[(CH_2)_nO]_mCH_3$ ,  $O(CH_2)_nNH_2$ ,  $O(CH_2)_nCH_3$ ,  $O(CH_2)_nONH_2$ ,  $OCH_2C(=O)N(H)CH_3$ , y  $O(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3]_2$ , donde n y m son de 1 a aproximadamente 10. También pueden seleccionarse otros grupos sustituyentes 2': alquilo  $C_1-C_{12}$ ; alquilo sustituido; alqueno; alquinilo; alcarilo; aralquilo; O-alcarilo u O-aralquilo; SH; SCH<sub>3</sub>; OCN; Cl; Br; CN; CF<sub>3</sub>; OCF<sub>3</sub>; SOCH<sub>3</sub>; SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>; ONO<sub>2</sub>; NO<sub>2</sub>; N<sub>3</sub>; NH<sub>2</sub>; heterocicloalquilo; heterocicloalcarilo; aminoalquilamino; polialquilamino; sililo sustituido; una R; un grupo de escisión; un grupo de reporteros; un intercalador; un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas; y un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto antisentido y otros sustituyentes que tienen propiedades similares. En algunas modalidades, los nucleósidos modificados comprenden una cadena lateral 2'-MOE {ver, por ejemplo, Baker y otros, J. Biol. Chem., 1997, 272, 1 1944-12000}. Se ha descrito que tal sustitución de 2'-MOE tiene una afinidad de unión mejorada en comparación con los nucleósidos no modificados y con otros nucleósidos modificados, tales como 2'-O-metilo, O-propilo y O-aminopropilo. También se ha demostrado que los oligonucleótidos que tienen el sustituyente 2'-MOE son inhibidores antisentido de la expresión génica con características prometedoras para su uso in vivo {ver, por ejemplo, Martin, P., He/v. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann y otros, Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann y otros, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; y Altmann y otros, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926}.

25 Como se usa en la presente descripción, un "nucleósido de tetrahidropirano modificado" o "nucleósido de THP modificado" significa un nucleósido que tiene un "azúcar" de tetrahidropirano de seis miembros sustituido en el residuo de pentofuranosilo en nucleósidos normales (un sustituto de azúcar). Los nucleósidos de THP modificados incluyen, pero sin limitarse a, lo que se denomina en la técnica ácido nucleico de hexitol (HNA), ácido nucleico de anitol (ANA), ácido nucleico de manitol (MNA) {ver Leumann, C.J. Bioorg. and Med. Chem. (2002) 10:841-854}, fluoro HNA (F-HNA), o los compuestos definidos por la Fórmula X:



X en donde independientemente para cada uno de dicho al menos un análogo nucleosídico de tetrahidropirano de la Fórmula X:

Bx es una porción de base heterocíclico;

50 T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> son cada uno, independientemente, un grupo de enlace internucleosídico que enlaza el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto antisentido o uno de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> es un grupo de enlace internucleosídico que enlaza el análogo nucleosídico de tetrahidropirano al compuesto antisentido y al otro de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> es H, un grupo protector de hidroxilo, un grupo de conjugado unido, o un grupo terminal 5' o 3'; q<sub>1</sub>, q<sub>2</sub>, q<sub>3</sub>, q<sub>4</sub>, q<sub>5</sub>, q<sub>6</sub> y q<sub>7</sub> son cada uno, independientemente, H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>, alqueno C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido, alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> o alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> sustituido; y uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es hidrógeno y el otro se selecciona de halógeno, alcoxi sustituido o no sustituido, NJ, J<sub>2</sub>, SJ, N<sub>3</sub>, OC(=X)J<sub>1</sub>, OC(=X)NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>NJ<sub>3</sub>C (= X) NJ<sub>1</sub>J<sub>2</sub>, y CN, en donde X es O, S o NJ<sub>1</sub> y cada J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, y J<sub>3</sub> es, independientemente, H o alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

60 En algunas modalidades, se proporcionan los nucleósidos de THP modificados de la Fórmula X en donde q<sub>m</sub>, q<sub>n</sub>, q<sub>p</sub>, q<sub>r</sub>, q<sub>s</sub>, q<sub>t</sub>, y q<sub>u</sub> son cada uno H. En algunas modalidades, al menos uno de q<sub>m</sub>, q<sub>n</sub>, q<sub>p</sub>, q<sub>r</sub>, q<sub>s</sub>, q<sub>t</sub> y q<sub>u</sub> es diferente de H. En algunas modalidades, al menos uno de q<sub>m</sub>, q<sub>n</sub>, q<sub>p</sub>, q<sub>r</sub>, q<sub>s</sub>, q<sub>t</sub> y q<sub>u</sub> es metilo. En algunas modalidades, se proporcionan nucleósidos de THP de fórmula X en donde uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> es F. En algunas modalidades, R<sub>1</sub> es fluoro y R<sub>2</sub> es H, R<sub>1</sub> es metoxi y R<sub>2</sub> es H y R<sub>1</sub> es metoxietoxi y R<sub>2</sub> es H.

65 Como se usa en la presente descripción, "modificado en 2'" o "sustituido en 2'" se refiere a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un sustituyente en la posición 2' diferente de H u OH. Los nucleósidos modificados en 2' incluyen, pero no se limitan a, nucleósidos con sustituyentes 2' no en puente, tales como alilo, amino, azido, tio, O-alilo, O-alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, -OCF<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-CH<sub>3</sub>, 2'-O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>SCH<sub>3</sub>, O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O- N (R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), o O-CH<sub>2</sub>-C(=O)-N(R<sub>m</sub>)(R<sub>n</sub>), donde

cada  $R_m$  y  $R_n$ , es, independientemente, H o alquilo  $C_1$ - $C_{10}$  sustituido o no sustituido. Los nucleósidos modificados en 2' pueden comprender además otras modificaciones, por ejemplo, en otras posiciones del azúcar y/o en la nucleobase.

Como se usa en la presente descripción, "2'-F" se refiere a un azúcar que comprende un grupo fluoro en la posición 2'.

Como se usa en la presente descripción, "2'-OMe" o "2'-OCH<sub>3</sub>" o "2'-O-metilo" se refiere cada uno a un nucleósido que comprende un azúcar que comprende un grupo -OCH<sub>3</sub> en la posición 2' del anillo de azúcar.

Como se usa en la presente descripción, "oligonucleótido" se refiere a un compuesto que comprende una pluralidad de nucleósidos unidos.

En algunas modalidades, se modifica uno o más de la pluralidad de nucleósidos. En algunas modalidades, un oligonucleótido comprende uno o más ribonucleósidos (ARN) y/o desoxirribonucleósidos (ADN).

También se conocen en la técnica muchos otros sistemas de anillos sustitutos de azúcar biciclo y triciclo que pueden usarse para modificar nucleósidos para su incorporación en compuestos antisentido {ver, por ejemplo, el artículo de revisión: Leumann, J. C, Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2002, 10, 841-854}. Tales sistemas de anillo pueden sufrir varias sustituciones adicionales para mejorar la actividad. Los métodos para las preparaciones de azúcares modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica. En los nucleótidos que tienen porciones de azúcar modificados, las porciones de nucleobase (naturales, modificados o una combinación de estos) se mantienen para la hibridación con una diana de ácido nucleico apropiada.

En algunas modalidades, los compuestos antisentido comprenden uno o más nucleótidos que tienen porciones de azúcar modificados. En algunas modalidades, la porción de azúcar modificado es 2'-MOE. En algunas modalidades, los nucleótidos modificados con 2'-MOE están dispuestos en un motivo gápmero. En algunas modalidades, la porción de azúcar modificado es un cEt. En algunas modalidades, los nucleótidos modificados con cEt están dispuestos a lo largo de las alas de un motivo gápmero.

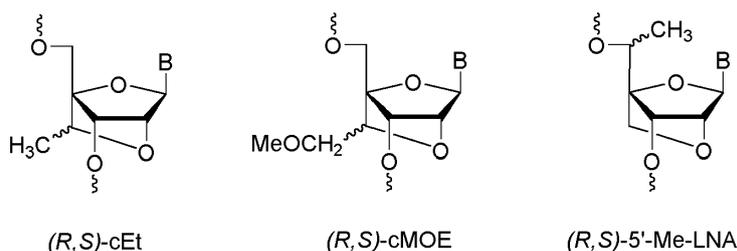
En algunas modalidades, en el LNA,  $R^{4'}$  y  $R^{2'}$  juntos designan el birradical -O-CH(CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>)-(ácido nucleico bicíclico 2'-metoxietilo - Seth y otros, 2010, J. Org. Chem) - ya sea en la configuración R o S.

En algunas modalidades, en el LNA,  $R^{4'}$  y  $R^{2'}$  juntos designan el birradical -O-CH(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) - (ácido nucleico bicíclico 2'-etilo - Seth y otros, 2010, J. Org. Chem). - ya sea en la configuración R o S.

En algunas modalidades, en el LNA,  $R^{4'}$  y  $R^{2'}$  juntos designan el birradical -O-CH(CH<sub>3</sub>)-. - ya sea en la configuración R o S. En algunas modalidades,  $R^{4'}$  y  $R^{2'}$  juntos designan el birradical -O-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>- (Seth y otros, 2010, J. Org. Chem).

En algunas modalidades, en el LNA,  $R^{4'}$  y  $R^{2'}$  juntos designan el birradical -O-NR-CH<sub>3</sub>- (Seth y otros, 2010, J. Org. Chem).

En algunas modalidades, las unidades de LNA tienen una estructura seleccionada del siguiente grupo:



La incorporación de análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad en el oligómero, tales como LNA o azúcares sustituidos en 2', puede permitir que se reduzca el tamaño del oligómero de unión específica, y también puede reducir el límite superior al tamaño del oligómero antes que tenga lugar una unión no específica o aberrante.

Se ha evaluado la nefrotoxicidad de un compuesto cET (mediante el uso de (S)-cET, con la secuencia (Compuesto ID 6/411847 de WO2009/12495 y un compuesto comparativo beta-D-oxi LNA (6/392063 de WO2009/12495) y se descubrió que los compuestos cET provocan una nefrotoxicidad sorprendentemente alta en comparación con el control de beta-D-oxi LNA. El estudio fue un estudio de dosis única, con sacrificio después de 3 días (ver el ejemplo 41 del documento EP1984381 para la metodología, aunque se usaron ratones NMRI). La nefrotoxicidad se confirmó mediante análisis histológico. Se observaron signos notables de nefrotoxicidad en las dosis del compuesto cET por debajo de aquellas en las que se observó ALT en suero, lo que indica que para los compuestos cET, la nefrotoxicidad puede ser un problema particular. El uso de los conjugados de la presente invención, tales como los conjugados de GalNAc trivalentes, por lo tanto, son muy útiles para reducir la nefrotoxicidad de los compuestos de LNA, como los compuestos cET.

El oligómero de la presente invención comprende al menos 1 ácido nucleico bloqueado (LNA). En algunas modalidades el oligómero comprende al menos 2 análogos nucleotídicos. En algunas modalidades, el oligómero comprende de 3-8

análogos nucleotídicos, por ejemplo, 6 o 7 análogos nucleotídicos. Al menos uno de dichos análogos nucleotídicos es un ácido nucleico bloqueado (LNA); por ejemplo, al menos 3 o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7 u 8, de los análogos nucleotídicos pueden ser LNA. En algunas modalidades todos los análogos nucleotídicos pueden ser LNA.

- 5 Se reconocerá que cuando se hace referencia a un motivo de secuencia nucleotídica o secuencia nucleotídica preferida, que consiste solo en nucleótidos, los oligómeros de la invención que se definen por esa secuencia pueden comprender un análogo nucleotídico correspondiente en lugar de uno o más de los nucleótidos presentes en dicha secuencia, tales como las unidades de LNA u otros análogos nucleotídicos, que aumentan la estabilidad del dúplex/ $T_m$  del oligómero/dúplex diana (*es decir*, análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad).
- 10 Un análogo nucleotídico preferido es LNA, tal como oxi-LNA (tal como beta-D-oxi-LNA y alfa-L-oxi-LNA), y/o amino-LNA (tal como beta-D-amino-LNA y alfa-L-amino-LNA) y/o tio-LNA (tal como beta-D-tio-LNA y alfa-L-tio-LNA) y/o ENA (tal como beta-D-ENA y alfa-L-ENA).

- 15 En algunas modalidades, el oligómero de la invención, tal como la región A, puede comprender unidades de LNA y otros análogos nucleotídicos. Otros análogos nucleotídicos presentes dentro del oligómero de la invención se seleccionan independientemente de, por ejemplo: unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, unidades de 2'-fluoro-ADN, unidades de LNA, unidades de ácido arabino nucleico (ANA), unidades de 2'-fluoro-ANA, unidades de HNA, unidades de INA (ácido nucleico intercalante -Christensen, 2002. Nucl. Acids. Res. 2002 30: 4918-4925) y unidades de 2'MOE. En algunas modalidades solo hay uno de los tipos anteriores de análogos nucleotídicos presentes en el oligómero de la invención, es decir, unidades de LNA, tales como la primera región, o la secuencia nucleotídica contigua de esta.

- 20 Por lo tanto, el oligómero de acuerdo con la invención (región A) comprende al menos una unidad de ácido nucleico bloqueado (LNA), tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 unidades de LNA, tal como de 3 - 7 o 4 a 8 unidades de LNA, o 3, 4, 5, 6 o 7 unidades de LNA. En algunas modalidades, todos los análogos nucleotídicos son LNA. En algunas modalidades, el oligómero puede comprender tanto beta-D-oxi-LNA como una o más de las siguientes unidades de LNA: tio-LNA, amino-LNA, oxi-LNA y/o ENA ya sea en las configuraciones beta-D o alfa-L o combinaciones de estas. En algunas modalidades, todas las unidades de LNA y citosina son 5'metil-citosina. En algunas modalidades de la invención, el oligómero (tal como la primera y opcionalmente las segundas regiones) puede comprender tanto unidades de LNA como de ADN. En algunas modalidades, el total combinado de unidades de LNA y ADN es 10-20, tal como 10 - 18, tal como 12-16. En algunas modalidades de la invención, la secuencia nucleotídica del oligómero, de la primera región de este, tal como la secuencia nucleotídica contigua consiste en al menos un LNA y las unidades de nucleótidos restantes son unidades de ADN. En algunas modalidades, el oligómero, o primera región de este, comprende solo LNA, análogos nucleotídicos y nucleótidos de origen natural (tales como ARN o ADN, con la máxima preferencia nucleótidos de ADN), opcionalmente con enlaces internucleotídicos modificados tales como fosforotioato.

- 35 Reclutamiento de RNAsa

- Se reconoce que un compuesto oligomérico puede funcionar a través de la degradación no mediada por RNAsa del ARNm diana, tal como por impedimento estérico de la traducción u otros métodos. En algunas modalidades, los oligómeros de la invención son capaces de reclutar una endorribonucleasa (RNAsa), tal como RNAsa H.

- 40 Es preferible que tales oligómeros, tales como la región A, o la secuencia nucleotídica contigua, comprenda una región de al menos 4, tal como al menos 5, tal como al menos 6, tal como al menos 7 unidades de nucleótidos consecutivas, tal como al menos 8 o al menos 9 unidades de nucleótidos consecutivos (residuos), incluidos 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16 nucleótidos consecutivos, que, cuando se forman en un dúplex con el ARN diana complementario, son capaces de reclutar RNAsa (tales como unidades de ADN). La secuencia contigua que es capaz de reclutar RNAsa puede ser la región Y' a la que se hace referencia en el contexto de un gápmo como se describe en la presente descripción. En algunas modalidades el tamaño de la secuencia contigua que es capaz de reclutar RNAsa, como la región Y', puede ser mayor, tal como 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 unidades de nucleótidos.

- 50 El documento EP 1 222 309 proporciona métodos *in vitro* para determinar la actividad de RNAsaH, que pueden usarse para determinar la capacidad de reclutar RNAsaH. Se considera que un oligómero es capaz de reclutar RNAsa H si, cuando se proporciona con la diana de ARN complementario, tiene una tasa inicial, según se mide en pmol//min, de al menos 1 %, tal como al menos 5 %, tal como al menos 10 % o más del 20 % de la tasa inicial determinada mediante el uso de oligonucleótido de ADN solo, que tiene la misma secuencia de bases pero que contiene solo monómeros de ADN, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los monómeros en el oligonucleótido, mediante el uso de la metodología proporcionada por el Ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

- 60 En algunas modalidades, se considera que un oligómero es esencialmente incapaz de reclutar RNAsaH si, cuando se proporciona la diana de ARN complementario, y RNAsaH, la tasa inicial de RNAsaH, medida en pmol//min, es inferior al 1 %, tal como menos de 5 %, tal como menos del 10 % o menos del 20 % de la tasa inicial determinada mediante el uso del oligonucleótido solo de ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, mediante el uso de la metodología proporcionada por el Ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

65

En otras modalidades, se considera que un oligómero es capaz de reclutar RNasaH si, cuando se proporciona con la diana de ARN complementario, y RNasaH, la tasa inicial de RNasaH, medida en pmol//min, es al menos 20 %, tal como al menos 40 %, tal como al menos 60 %, tal como al menos 80 % de la tasa inicial determinada mediante el uso del oligonucleótido solo de ADN equivalente, sin sustituciones en 2', con grupos de enlace fosforotioato entre todos los nucleótidos en el oligonucleótido, mediante el uso de la metodología proporcionada por el Ejemplo 91 - 95 del documento EP 1 222 309.

Típicamente, la región del oligómero que forma las unidades de nucleótidos consecutivos que, cuando se forman en un dúplex con el ARN diana complementario es capaz de reclutar RNasa, consiste en unidades de nucleótidos que forman un dúplex similar al ADN/ARN con la diana de ARN. El oligómero de la invención, tal como la primera región, puede comprender una secuencia nucleotídica que comprende tanto nucleótidos como análogos nucleotídicos, y está en forma de un gápmo de LNA.

Diseño de gápmo

El oligómero de la invención es un gápmo de LNA. Un oligómero gápmo es un oligómero que comprende un tramo contiguo de nucleótidos que es capaz de reclutar una RNasa, tal como ARNasaH, tal como una región de al menos 6 o 7 nucleótidos de ADN, denominada en la presente descripción región Y' (Y'), en donde la región Y' está flanqueada tanto 5' como 3' por regiones de análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad, tales como de 1 - 6 análogos nucleotídicos 5' y 3' hasta el tramo contiguo de nucleótidos que es capaz de reclutar RNasa - estas regiones se denominan regiones X' (X') y Z'(Z'), respectivamente. Las regiones X' y Z' también pueden denominarse alas del gápmo. Ejemplos de gápmos se describen en los documentos WO2004/046160, WO2008/113832, y WO2007/146511.

En algunas modalidades, los monómeros que son capaces de reclutar RNasa se seleccionan del grupo que consiste en monómeros de ADN, monómeros de alfa-L-LNA, monómeros de ADN alquilado en C4'(ver el documento PCT/EP2009/050349 y Vester y otros, Bioorg. Med. Chem. Lett. 18 (2008) 2296 - 2300) y nucleótidos UNA (ácido nucleico no unido) (ver Fluiter y otros, Mol. Biosyst., 2009, 10, 1039 incorporado en la presente como referencia). UNA es ácido nucleico desbloqueado, típicamente donde se ha eliminado el enlace C-C entre C2 - C3 de la ribosa, formando un residuo de "azúcar" desbloqueado. Preferentemente, el gápmo de LNA comprende una secuencia (poli)nucleotídica de fórmula (5' a 3'), X'-Y'-Z', en donde; la región X' (X') (región 5') consiste en o comprende al menos un análogo nucleotídico, tal como al menos una unidad de LNA, tal como de 1-6 análogos nucleotídicos, tales como unidades de LNA, y; la región Y' (Y') consiste en o comprende al menos cuatro o al menos cinco nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar RNasa (cuando se forman en un dúplex con una molécula de ARN complementaria, tal como la diana de ARNm), tales como los nucleótidos de ADN, y; la región Z' (Z') (región 3') consiste en o comprende al menos un análogo nucleotídico, tal como al menos una unidad de LNA, tal como de 1-6 análogos nucleotídicos, tales como unidades de LNA.

En algunas modalidades, la región X' consiste en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos nucleotídicos, tales como unidades de LNA, tales como de 2-5 análogos nucleotídicos, tales como 2-5 unidades de LNA, tales como 3 o 4 análogos nucleotídicos, tales como 3 o 4 unidades de LNA; y/o la región Z consiste en 1, 2, 3, 4, 5 o 6 análogos nucleotídicos, tales como. Unidades de LNA, tales como de 2-5 análogos nucleotídicos, tales como 2-5 unidades de LNA, tales como 3 o 4 análogos nucleotídicos, tales como 3 o 4 unidades de LNA.

En algunas modalidades Y' consiste en o comprende 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar RNasa, o de 4-12 o de 6-10, o de 7-9, tal como 8 nucleótidos consecutivos que son capaces de reclutar RNasa. En algunas modalidades, la región Y' consiste en o comprende al menos una unidad de nucleótidos de ADN, tal como 1-12 unidades de ADN, preferentemente de 4-12 unidades de ADN, con mayor preferencia de 6-10 unidades de ADN, tal como de 7-10 unidades de ADN, con la máxima preferencia 8, 9 o 10 unidades de ADN.

En algunas modalidades, la región X' consiste en 3 o 4 análogos nucleotídicos, tal como LNA, la región X' consiste en 7, 8, 9 o 10 unidades de ADN, y la región Z' consiste en 3 o 4 análogos nucleotídicos, tal como LNA. Tales diseños incluyen (X'-Y'-Z') 3-10-3, 3-10-4, 4-10-3, 3-9-3, 3-9-4, 4-9-3, 3-8-3, 3-8-4, 4-8-3, 3-7-3, 3-7-4, 4-7-3. En una modalidad preferida el gápmo es un gápmo 3-9-4, incluso más preferido es un gápmo 3-10-3.

Otros diseños de gápmo se describen en el documento WO2004/046160. El documento WO2008/113832, que reivindica la prioridad de la solicitud provisional de los Estados Unidos 60/977,409, se refiere a oligómeros gápmo 'más cortos'. En algunas modalidades, los oligómeros presentados aquí pueden ser tales gápmos más cortos.

En algunas modalidades el oligómero, por ejemplo, la región X', consiste en una secuencia nucleotídica contigua de un total de 10, 11, 12, 13 o 14 unidades de nucleótidos, en donde la secuencia nucleotídica contigua comprende o es de fórmula (5' - 3'), X'-Y'-Z' en donde; X' consiste en 1, 2 o 3 unidades de análogos nucleotídicos, tales como unidades de LNA; Y' consiste en 7, 8 o 9 unidades de nucleótidos contiguos que son capaces de reclutar RNasa cuando se forman en un dúplex con una molécula de ARN complementaria (tal como una diana de ARNm); y Z' consiste en 1, 2 o 3 unidades de análogo nucleotídico, tales como las unidades de LNA.

En algunas modalidades, X' consiste en 1 unidad de LNA. En algunas modalidades, X' consiste en 2 unidades de LNA. En algunas modalidades, X' consiste en 3 unidades de LNA. En algunas modalidades, Z' consiste en 1 unidades de LNA.

En algunas modalidades, Z' consiste en 2 unidades de LNA. En algunas modalidades, Z' consiste en 3 unidades de LNA. En algunas modalidades, Y' consiste en 7 unidades de nucleótidos. En algunas modalidades, Y' consiste en 8 unidades de nucleótidos. En algunas modalidades, Y' consiste en 9 unidades de nucleótidos. En ciertas modalidades, la región Y' consiste en 10 monómeros nucleosídicos. En ciertas modalidades, la región Y' consiste en o comprende 1 - 10 monómeros de ADN. En algunas modalidades, Y' comprende de 1 - 9 unidades de ADN, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades de ADN. En algunas modalidades Y' consiste en unidades de ADN. En algunas modalidades, Y' comprende al menos una unidad de LNA que está en la configuración alfa-L, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 unidades LNA en la configuración alfa-L. En algunas modalidades, Y' comprende al menos una unidad de alfa-L-oxi-LNA o en donde todas las unidades de LNA en la configuración alfa-L-son unidades de alfa-L-oxi-LNA. En algunas modalidades el número de nucleótidos presentes en X'-Y'-Z' se selecciona del grupo que consiste en (unidades de análogos nucleotídicos - región Y' - unidades de análogos nucleotídicos): 1-8-1, 1-8-2, 2-8-1,2-8-2, 3-8-3, 2-8-3, 3-8-2, 4-8-1, 4-8-2, 1-8-4, 2-8-4, o; 1-9-1, 1-9-2, 2-9-1, 2-9-2, 2-9-3, 3-9-2, 1-9-3, 3-9-1, 4-9-1, 1-9-4, o; 1-10-1, 1-10-2, 2-10-1, 2-10-2, 1-10-3, 3-10-1, 2-10-3, 3-10-2. En algunas modalidades, el número de nucleótidos en X'-Y'-Z' se selecciona del grupo que consiste en: 2-7-1, 1-7-2, 2-7-2, 3-7-3, 2-7-3, 3-7-2, 3-7-4, y 4-7-3. En ciertas modalidades, cada una de las regiones X' e Y' consiste en tres monómeros de LNA, y la región Y' consiste en 8 o 9 o 10 monómeros de nucleosídicos, preferentemente monómeros de ADN. En algunas modalidades tanto X' como Z' consisten en dos unidades de LNA cada una, e Y' consiste en 8 o 9 unidades de nucleótidos, preferentemente unidades de ADN. En diversas modalidades, otros diseños de gápmo incluyen aquellos en los que las regiones X' y/o Z' consisten en 3, 4, 5 o 6 análogos nucleosídicos, tales como monómeros que contienen un azúcar 2'-O-metoxietil-ribose (2'-MOE) o monómeros que contienen un azúcar 2'-fluoro-desoxirribose, y la región Y' consiste en 8, 9, 10, 11 o 12 nucleosídicos, tal como los monómeros de ADN, donde las regiones X'-Y'-Z' tienen 3-9-3, 3-10-3, 5-10-5 o 4-12-4 monómeros. Otros diseños de gápmo se describen en el documento WO 2007/146511A2.

Gápmos de LNA: Un gápmo de LNA es un oligómero gápmo (región A) que comprende al menos un nucleótido de LNA. La SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 40 son oligómeros gápmo de LNA. Los oligómeros con una secuencia contigua de 10 - 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 33 o 34 o 45 también pueden ser oligómeros gápmo tales como los gápmo de LNA.

#### Enlaces internucleotídicos

Los monómeros de nucleosídicos de los oligómeros (por ejemplo, regiones primera y segunda) descritos en la presente descripción se acoplan entre sí mediante grupos de enlace internucleosídico. Adecuadamente, cada monómero está unido al monómero adyacente 3' a través de un grupo de enlace.

El experto en la materia entenderá que, en el contexto de la presente invención, el monómero 5' al final de un oligómero no comprende un grupo de enlace 5', aunque puede o no comprender un grupo terminal 5' o un grupo de enlace para la conjugación.

La frase "grupo de enlace" o "enlace internucleotídicos" pretende significar un grupo capaz de acoplar covalentemente dos nucleótidos. Los ejemplos específicos y preferidos incluyen grupos fosfato y grupos fosforotioato. El enlace internucleosídico puede usarse indistintamente con el enlace internucleotídicos.

Los nucleótidos del oligómero de la invención o la secuencia de nucleótidos contiguos de este se acoplan entre sí a través de grupos de enlace. Adecuadamente cada nucleótido está unido al nucleótido adyacente 3' a través de un grupo de enlace.

Los enlaces internucleotídicos adecuados incluyen los enumerados en el documento WO2007/031091, por ejemplo, los enlaces internucleotídicos enumerados en el primer párrafo de la página 34 del documento WO2007/031091. Es, en algunas modalidades, diferente del(de los) enlace(s) fosfodiéster de la región B (donde está presente), se prefiere modificar el enlace internucleotídicos de su fosfodiéster normal a uno que sea más resistente al ataque de nucleasas, tal como fosforotioato o boranofosfato - estos dos, al ser escindibles por la RNasa H, también permiten esa ruta de inhibición antisentido para reducir la expresión del gen diana.

En algunas modalidades, el oligómero de la presente invención comprende uno o más enlaces nucleosídicos seleccionados del grupo que consiste en fosforotioato, fosforoditioato y boranofosfato.

Pueden preferirse enlaces internucleotídicos que contienen azufre (S) adecuados como se proporciona en la presente descripción, tales como fosforotioato o fosfoditioato. También se prefieren los enlaces internucleotídicos de fosforotioato, particularmente para la primera región, tal como en gápmos, míxmeros, oligómeros de conmutación de empalme antimis y totalmeros.

El término "míxmero" se refiere a oligómeros que comprenden nucleótidos tanto de origen natural como no natural, donde, a diferencia de los gápmos, tailmeros y headmeros, no hay una secuencia contigua de más de 5, y en algunas modalidades no más de 4 consecutivos, tal como no más de tres nucleótidos consecutivos de origen natural, tal como las unidades de ADN.

El término "totalmero" se refiere a un oligómero monocatenario que solo comprende nucleósidos de origen no natural, tales como análogos nucleosídicos modificados con azúcar.

5 Para los gápmers, los enlaces internucleotídicos en el oligómero pueden ser, por ejemplo, fosforotioato o boranofosfato para permitir la escisión por ARNasa H del ARN seleccionado. Se prefiere el fosforotioato, para mejorar la resistencia a nucleasas y otras razones, tal como la facilidad de fabricación.

10 En un aspecto, con la excepción del enlace fosfodiéster entre la región primera y segunda, y opcionalmente dentro de la región B, los enlaces internucleosídicos restantes del oligómero de la invención, los nucleótidos y/o análogos nucleotídicos están unidos entre sí por medio de grupos fosforotioato. En algunas modalidades, al menos el 50 %, tal como al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, tal como al menos el 90 % tal como todos los enlaces internucleosídicos entre nucleósidos en la primera región son diferentes al fosfodiéster (fosfato), tal como como se seleccionan del grupo que consiste en fosforotioato, fosforoditioato o boranofosfato. En algunas modalidades, al menos el 50 %, tal como al menos el 70 %, tal como al menos el 80 %, tal como al menos el 90 % tal como todos los enlaces internucleosídicos entre nucleósidos en la primera región son fosforotioato.

20 El documento WO09124238 se refiere a compuestos oligoméricos que tienen al menos un nucleósido bicíclico unido a los extremos 3' o 5' por un enlace internucleosídico neutro. Por lo tanto, el oligómero de la invención puede tener al menos un nucleósido bicíclico unido a los extremos 3' o 5' por un enlace internucleosídico neutro, tal como uno o más fosfotriéster, metilfosfonato, MMI, amida-3, formacetal o tioformacetal. Los enlaces restantes pueden ser fosforotioato.

#### Conjugados de oligómeros (Región C)

25 Se describe además un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende un oligómero de la invención, y al menos una porción no nucleotídica o no polinucleotídica (C) unido covalentemente a dicho oligómero (A), opcionalmente a través de una región enlazadora posicionada entre la secuencia contigua del oligómero y la porción de conjugado (B y/o Y).

30 Los porciones conjugados representativos que se han usado con oligonucleótidos pueden incluir moléculas lipofílicas (aromáticas y no aromáticas) incluidas moléculas esteroideas; proteínas (por ejemplo, anticuerpos, enzimas, proteínas séricas); péptidos; vitaminas (solubles en agua o solubles en lípidos); polímeros (solubles en agua o solubles en lípidos); moléculas pequeñas incluidos fármacos, toxinas, moléculas reporteras y ligandos receptores; complejos de carbohidratos; complejos de escisión de ácido nucleico; quelantes de metales (por ejemplo, porfirinas, texafirinas, éteres corona, etc.); intercaladores incluidos fotonucleasa/intercaladores híbridos; agentes de reticulación (por ejemplo, fotoactivos, redox activos) y combinaciones y derivados de estos. Se proporcionan numerosos porciones conjugados adecuados, su preparación y enlace a compuestos oligoméricos, por ejemplo, en el documento WO 93/07883 y la patente de Estados Unidos No. 6,395,492. Los conjugados de oligonucleótidos y su síntesis también se informan en revisiones exhaustivas por Manoharan in Antisense Drug Technology, Principles, Strategies, and Applications, S.T. Crooke, ed., Ch. 16, Marcel Dekker, Inc., 2001 y Manoharan, Antisense and Nucleic Acid Drug Development, 2002, 12, 103.

40 Un aspecto adicional de la invención proporciona un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende

45 a. un oligómero antisentido (A) de entre 16 - 22 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31, y en donde dicho oligómero antisentido es un gápmers de LNA, y

b. al menos una porción de conjugado (C) que se dirige al receptor de asialoglicoproteína unido covalentemente a dicho oligómero (A).

50 En algunas modalidades el oligómero de la invención se dirige al hígado - *es decir*, después de la administración sistémica el compuesto se acumula en las células del hígado (tales como los hepatocitos). El direccionamiento al hígado puede mejorarse en gran medida mediante la adición de una porción de conjugado (C). Sin embargo, para maximizar la eficacia del oligómero frecuentemente es deseable que el conjugado (o porción de direccionamiento) esté unido al oligómero a través de un enlazador bioescindible (B), tal como un enlazador de fosfato de nucleótido. Por lo tanto, es deseable usar una porción de conjugado que mejore la absorción y la actividad en los hepatocitos. La mejora de la actividad puede deberse a una mejor absorción o puede deberse a una mejor potencia del compuesto en los hepatocitos.

60 Se describe un compuesto oligomérico en forma de un oligómero de LNA, tal como un gápmers, o por ejemplo un oligómero antisentido de LNA, (que puede denominarse región A en la presente descripción) que comprende un oligómero antisentido, opcionalmente un enlazador bioescindible, tal como región B y un conjugado de carbohidratos (que puede denominarse región C). El oligómero antisentido de LNA puede tener de 7 - 30, tal como 8 - 26 nucleósidos de longitud y comprende al menos una unidad de LNA (nucleósido).

65 En algunas modalidades, el conjugado es o puede comprender un carbohidrato o comprende un grupo carbohidrato. En algunas modalidades, el carbohidrato se selecciona del grupo que consiste en galactosa, lactosa, n-acetilgalactosamina, manosa y manosa-6-fosfato. En algunas modalidades, el grupo de conjugado es o puede comprender manosa o manosa-

6-fosfato. Los conjugados de carbohidratos pueden usarse para mejorar el suministro o la actividad en una variedad de tejidos, tal como hígado y/o músculo. Ver, por ejemplo, el documento EP1495769, documento WO99/65925, Yang y otros, Bioconjug Chem (2009) 20(2): 213-21. Zatsepin & Oretskaya Chem Biodivers. (2004) 1(10): 1401-17.

5 El conjugado de la presente invención comprende una porción de conjugado que se dirige al receptor de asialoglicoproteína en forma de una porción de carbohidrato, tal como una porción de GalNAc (que puede denominarse región C). La porción de carbohidrato puede ser multivalente, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4 o 4 porciones de carbohidrato idénticos o no idénticos pueden unirse covalentemente al oligómero, opcionalmente a través de un enlazador o enlazadores (tal como la región Y).

10

#### *Restos conjugados de GalNAc*

En algunas modalidades, la porción de carbohidrato no es un polímero de carbohidrato lineal. Sin embargo, la porción de carbohidrato puede ser multivalente, tal como, por ejemplo, 2, 3, 4 o 4 porciones de carbohidrato idénticas o no idénticas pueden unirse covalentemente al oligómero, opcionalmente a través de un enlazador o enlazadores. La invención proporciona un conjugado que comprende el oligómero de la invención y una porción de conjugado que se dirige a un receptor de asialoglicoproteína, tal como una porción de GalNAc, que puede formar parte de una región adicional (denominada región C).

20 La invención también proporciona un conjugado de oligonucleótidos antisentido que comprende

a. un oligómero antisentido (A) de entre 16 - 22 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31, y en donde dicho oligómero antisentido es un gápmo de LNA que comprende al menos una unidad de LNA, y

25

b. al menos una porción de conjugado (C) que se dirige al receptor de asialoglicoproteína unido covalentemente a dicho oligómero (A). En algunas modalidades, la porción de conjugado (tal como la tercera región o región C) comprende una porción que se dirige al receptor de asialoglicoproteína seleccionado del grupo que consiste en galactosa, galactosamina, N-formil-galactosamina, N-acetilgalactosamina, N-propionil-galactosamina, N-n-butanoil-galactosamina y N-isobutanoilgalactos-amina. En algunas modalidades el conjugado comprende una agrupación de galactosa, tal como el trímero de N-acetilgalactosamina. En algunas modalidades, la porción de conjugado comprende una GalNAc (N-acetilgalactosamina), tal como una GalNAc monovalente, divalente y trivalente de tetravalente. Los conjugados de GalNAc trivalentes pueden usarse para dirigir el compuesto al hígado. Los conjugados de GalNAc se han usado con metilfosfonato y oligonucleótidos antisentido de PNA (por ejemplo, documento US 5,994517 y Hangeland y otros, Bioconjug Chem. 1995 noviembre-diciembre;6(6):695-701) y ARNip (por ejemplo, los documentos WO2009/126933, WO2012/089352 y WO2012/083046). El documento WO2012/083046 describe los ARNip con porciones conjugados de GalNAc que comprenden moduladores farmacocinéticos escindibles, que son adecuados para su uso en la presente invención, los moduladores farmacocinéticos preferidos son grupos hidrófobos C16 tales como palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20. Los moduladores farmacocinéticos escindibles de '046 también pueden ser colesterol.

40

Los porciones de direccionamiento (porciones conjugados) pueden seleccionarse del grupo que consiste en: galactosa, galactosamina, N-formil-galactosamina, N-acetilgalactosamina, N-propionil-galactosamina, N-n-butanoil-galactosamina, N-iso-butanoilgalactos-amina, agrupación de galactosa y trímero de N-acetilgalactosamina y pueden tener un modulador farmacocinético seleccionado del grupo que consiste en: grupo hidrófobo que tiene 16 o más átomos de carbono, grupo hidrófobo que tiene 16-20 átomos de carbono, palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo, (9E,12E)-octadeca-9,12dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20, y colesterol. Ciertas agrupaciones de GalNAc descritas en '046 incluyen: (E)-hexadec-8-enoilo (C16), oleilo (C18), (9E,12E)-octadeca-9,12-dienoilo (C18), octanoilo (C8), dodececanoilo (C12), acilo C-20, acilo C24, dioctanoilo (2xC8). La porción de direccionamiento-modulador farmacocinético puede estar unido al polinucleótido a través de un enlace fisiológicamente lábil o, por ejemplo, un enlace disulfuro, o un enlazador de PEG. La invención también se refiere al uso de enlazadores de fosfodiéster entre el oligómero y el grupo de conjugado (en la presente descripción se denomina región B, y se colocan adecuadamente entre el oligómero de LNA y el grupo de conjugado de carbohidrato).

50

Para el direccionamiento de los hepatocitos en el hígado, un ligando de direccionamiento preferido es una agrupación de galactosa.

55

Una agrupación de galactosa comprende una molécula que tiene, por ejemplo, que comprende dos a cuatro derivados de galactosa terminales. Como se usa en la presente descripción, el término derivado de galactosa incluye tanto galactosa como derivados de galactosa que tienen afinidad por el receptor de asialoglicoproteína igual o mayor que el de galactosa. Un derivado de galactosa terminal está unido a una molécula a través de su carbono C-1. El receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) se expresa principalmente en los hepatocitos y se une a las glucoproteínas terminales de galactosa ramificadas. Una agrupación de galactosa preferida tiene tres galactosaminas terminales o derivados de galactosamina que tienen afinidad por el receptor de asialoglicoproteína. Una agrupación de galactosa más preferida tiene tres N-acetilgalactosaminas terminales. Otros términos comunes en la técnica incluyen galactosa tri-antennaria, galactosa trivalente y trímero de galactosa. Se conoce que las agrupaciones de derivados de galactosa tri-antennaria están unidas al ASGPr con mayor afinidad que las estructuras derivadas de galactosa bi-antennaria o mono-antennaria (Baenzigerand Fiete, 1980, Cell,

65

22, 611-620; Connolly y otros, 1982,1. Biol. Chem., 257,939-945). Se requiere multivalencia para lograr la afinidad nM. De acuerdo con el documento WO 2012/083046 la unión de un solo derivado de galactosa que tiene afinidad por el receptor de asialoglicoproteína no permite el suministro funcional del polinucleótido de ARNi a los hepatocitos in vivo cuando se coadministra con el polímero de suministro.

5

Una agrupación de galactosa puede comprender dos o preferentemente tres derivados de galactosa, cada uno unido a un punto de ramificación central. Los derivados de galactosa están unidos al punto de ramificación central a través de los carbonos C-1 de los sacáridos. El derivado de galactosa se une preferentemente al punto de ramificación a través de enlazadores o separadores. Un separador preferido es un separador hidrófilo flexible (patente de Estados Unidos 5885968; Biessen y otros J. Med. Chem. 1995 vol. 39 p. 1538-1546). Un separador hidrófilo flexible preferido es un separador de PEG. Un separador de PEG preferido es un separador de PEG3. El punto de ramificación puede ser cualquier molécula pequeña que permita la unión de los tres derivados de galactosa y además permita la unión del punto de ramificación al oligómero. Un grupo de puntos de ramificación ilustrativo es una di-lisina. Una molécula de di-lisina contiene tres grupos amina a través de los cuales pueden unirse tres derivados de galactosa y un grupo reactivo carboxilo a través del cual la di-lisina puede unirse al oligómero. La unión del punto de ramificación al oligómero puede producirse a través de un enlazador o separador. Un separador preferido es un separador hidrófilo flexible. Un separador hidrófilo flexible preferido es un separador de PEG. Un separador de PEG preferido es un separador de PEG3 (tres unidades de etileno). La agrupación de galactosa puede unirse al extremo 3' o 5' del oligómero mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

10

15

20

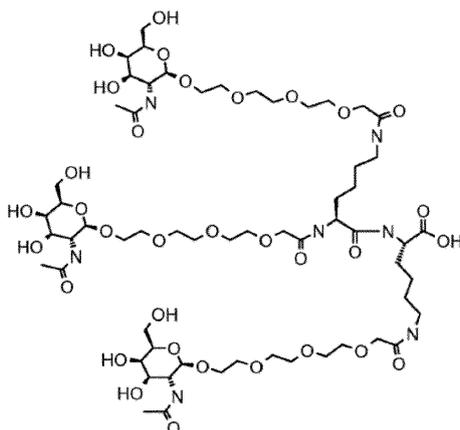
Un derivado de galactosa preferido es una N-acetil-galactosamina (GalNAc). Otros sacáridos que tienen afinidad por el receptor de asialoglicoproteína pueden seleccionarse de la lista que comprende: galactosamina, N-n-butanoilgalactosamina y N-iso-butanoilgalactosamina. Se han estudiado las afinidades de numerosos derivados de galactosa por el receptor de asialoglicoproteína (ver, por ejemplo: Jobst, S.T. y Drickamer, K. JB.C. 1996,271,6686) o se determinan fácilmente mediante el uso de métodos típicos en la técnica.

25

30

35

40

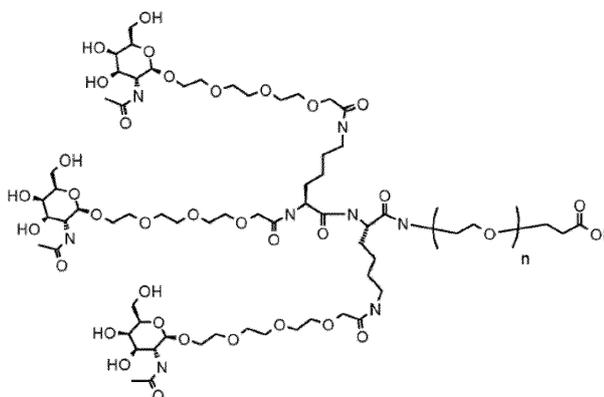


Una modalidad de una agrupación de galactosa

45

50

55

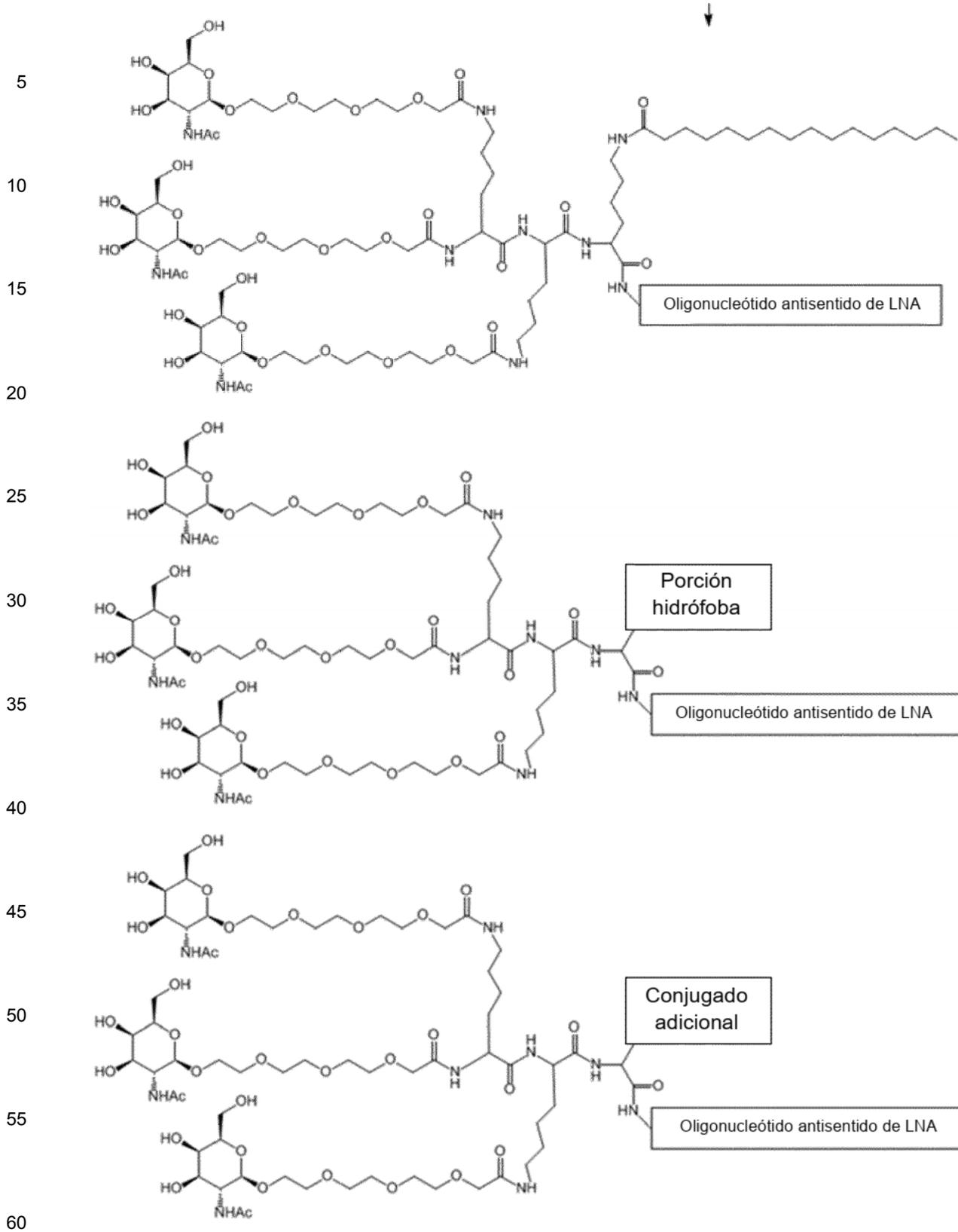


Agrupación de galactosa con separador de PEG entre el punto de ramificación y el ácido nucleico

60

Los ejemplos adicionales del conjugado de la invención se ilustran a continuación:

65



La porción hidrófobo o lipófilo (o conjugado adicional) (es decir, modulador farmacocinético) en los conjugados de la agrupación de GalNAc anterior es opcional, cuando se usan oligómeros de LNA, tales como oligonucleótidos antisentido de LNA.

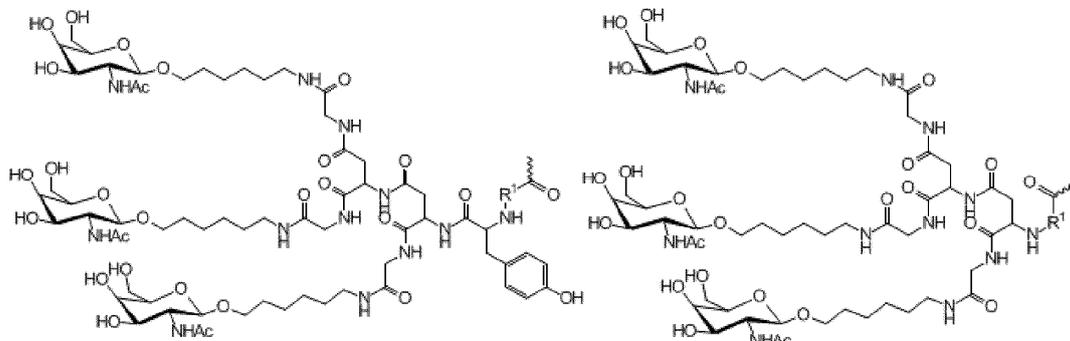
Ver las figuras para las agrupaciones de GalNAc específicas usadas en el presente estudio, Conj 1, 2, 3, 4 y Conj1 a, 2a, 3a y 4a (que se muestran con un enlazador C6 opcional que une la agrupación GalNAc al oligómero).

En una modalidad preferida de la invención la porción de conjugado del conjugado de oligonucleótidos antisentido comprende o consiste en Conj 1, 2, 3, 4 y Conj1a, 2a, 3a y 4a. Con la máxima preferencia, la porción de conjugado comprende o consiste en Conj 2a.

En otra modalidad preferida el conjugado de oligonucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO 18 y 19.

Por lo tanto, cada porción de carbohidrato de una agrupación de GalNAc (por ejemplo, GalNAc) puede unirse al oligómero a través de un separador, tal como un enlazador de (poli)etilenglicol (PEG), tal como un enlazador de di, tri, tetra, penta, hexaetilenglicol. Como se muestra arriba la porción de PEG forma un separador entre la porción de azúcar galactosa y un enlazador peptídico (se muestra trilisina).

En algunas modalidades, la agrupación de GalNAc comprende un enlazador peptídico, por ejemplo, un tripéptido Tyr-Asp(Asp) o un dipéptido Asp(Asp), que se une al oligómero (o a la región Y o región B) a través de un enlazador birradical, por ejemplo la agrupación de GalNAc puede comprender los siguientes enlazadores birradicales:



R<sup>1</sup> es un birradical preferentemente seleccionado de -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-, -C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>-, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-, 1,4-ciclohexil (-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), 1,4-fenil (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- o -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-, C(O)CH<sub>2</sub>-, -C(O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C(O)C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C(O)C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-, -C(O)C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>-, -C(O)C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-, 1,4-ciclohexil (-C(O)C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), 1,4-fenil (-C(O)C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), -C(O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C(O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- o -C(O)C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-.

En algunas modalidades, R<sup>1</sup> es un birradical preferentemente seleccionado de -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>-, -C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>-, -C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>-, -C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>-, 1,4-ciclohexil (-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>-), 1,4-fenil (-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-), -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>-, -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>2</sub>- o -C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>(OC<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-.

El conjugado de carbohidrato (por ejemplo, GalNAc), o la porción enlazadora de carbohidrato (por ejemplo, la porción de carbohidrato-PEG) puede unirse covalentemente (enlazarse) al oligómero a través de un grupo de punto de ramificación tal como un aminoácido o péptido, que comprende adecuadamente dos o más grupos amino (tal como 3, 4 o 5), tal como lisina, di-lisina o tri-lisina o tetra-lisina. Una molécula de tri-lisina contiene cuatro grupos amina a través de los cuales pueden unirse tres grupos conjugados de carbohidratos, tales como galactosa y derivados (por ejemplo, GalNAc) y un conjugado adicional tal como una porción/grupo hidrófobo o lipófilo y un grupo reactivo de carboxilo a través del cual la tri-lisina puede unirse al oligómero. El conjugado adicional, tal como la porción lipófila/hidrófobo puede unirse al residuo de lisina que se une al oligómero.

Sorprendentemente, los presentes inventores han encontrado que los conjugados de GalNAc para su uso con oligómeros de LNA no requieren un modulador farmacocinético (como se describe a continuación), y como tal, en algunas modalidades, el conjugado de GalNAc no se une covalentemente a una porción lipófilo o hidrófobo, tal como como los descritos aquí, por ejemplo, no comprenden un ácido graso C8 - C36 o un esteroil. Por lo tanto, la invención también proporciona conjugados de GalNAc y oligómero de LNA que no comprenden un modulador farmacocinético lipófilo o hidrófobo o porción/grupo de conjugado.

#### Moduladores Farmacocinéticos

El compuesto de la invención puede comprender además uno o más porciones conjugados adicionales, de los cuales los porciones lipófilos o hidrófobos son particularmente interesantes, tal como cuando el grupo de conjugado es una porción de carbohidrato. Tales porciones lipófilos o hidrófobos pueden actuar como moduladores farmacocinéticos, y pueden unirse covalentemente al conjugado de carbohidrato, un enlazador que une el conjugado de carbohidrato al oligómero o un enlazador que une múltiples conjugados de carbohidrato (multi-valente), o al oligómero, opcionalmente a través de un enlazador, tal como un enlazador bioescindible.

Por lo tanto, el oligómero o porción de conjugado puede comprender un modulador farmacocinético, tal como una porción lipófilo o hidrófobo. Tales porciones se describen dentro del contexto de conjugados de ARNip en el documento WO2012/082046. La porción hidrófoba puede comprender un ácido graso C8 - C36, que puede estar saturado o no saturado. En algunas modalidades, pueden usarse ácidos grasos C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, C30, C32 y C34. El grupo hidrófobo puede tener 16 o más átomos de carbono. Pueden seleccionarse grupos hidrófobos adecuados ilustrativos del grupo que comprende: esteroles, colesterol, palmitoilo, hexadec-8-enoilo, oleilo, (9E, 12E)-octadeca-9,12-dienoilo, dioctanoilo y acilo C16-C20. De acuerdo con el documento WO'346, los grupos hidrófobos que tienen menos de 16 átomos de carbono son menos eficaces para mejorar el direccionamiento de polinucleótidos, pero pueden usarse en múltiples copias (por ejemplo, 2x, tal como 2x C8 o C10, C12 o C14) para mejorar la eficacia. Los moduladores farmacocinéticos útiles como porciones de direccionamiento de polinucleótidos pueden seleccionarse del grupo que consiste en: colesterol, grupo alquilo, grupo alquenoilo, grupo alquinilo, grupo arilo, grupo aralquilo, grupo aralquenoilo y grupo aralquinilo, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. Los moduladores farmacocinéticos son preferentemente hidrocarburos, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, pueden permitirse sustituciones o heteroátomos que mantengan la hidrofobicidad, por ejemplo, flúor.

### *Conjugados lipófilos*

En algunas modalidades, el grupo de conjugado es o puede comprender una porción lipófilo, tal como un esteroles (por ejemplo, colesterol, colesterilo, colestanol, estigmasterol, ácido colánico y ergosterol). En algunas modalidades el conjugado es o comprende tocoferol (ejemplificado como Conj 6 y Conj 6a en la Figura 2). En algunas modalidades, el conjugado es o puede comprender colesterol (ejemplificado como Conj 5 y Conj 5a en la Figura 2).

En algunas modalidades, el conjugado es, o puede comprender un lípido, un fosfolípido o un alcohol lipófilo, tal como un lípido catiónico, un lípido neutro, esfingolípido y ácido graso tal como ácido esteárico, oleico, elaídico, linoleico, linoleaídico, linoléico, y mirístico. En algunas modalidades el ácido graso comprende una cadena de alquilo saturada o insaturada C4 - C30. La cadena alquilo puede ser lineal o ramificada.

Pueden usarse porciones de conjugados lipófilos, por ejemplo, para contrarrestar la naturaleza hidrófila de un compuesto oligomérico y mejorar la penetración celular.

Las porciones lipófilas incluyen, por ejemplo, esteroides, estanoles y esteroides y compuestos relacionados tales como colesterol (patente de Estados Unidos núm. 4,958,013 y Letsinger y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553), tiocolesterol (Oberhauser y otros, Nucl Acids Res., 1992, 20, 533), lanosterol, coprostanol, estigmasterol, ergosterol, calciferol, ácido cólico, ácido desoxicólico, estrona, estradiol, estratriol, progesterona, estilbestrol, testosterona y androsterona, desoxicorticosterona, cortisona, 17-hidroxycorticosterona, sus derivados y similares. En algunas modalidades, el conjugado puede seleccionarse del grupo que consiste en colesterol, tiocolesterol, lanosterol, coprostanol, estigmasterol, ergosterol, calciferol, ácido cólico, ácido desoxicólico, estrona, estradiol, estratriol, progesterona, estilbestrol, testosterona y androsterona, desoxicorticosterona, cortisona y 17-hidroxycorticosterona. Otras porciones de conjugados lipófilos incluyen grupos alifáticos, tales como, por ejemplo, alquilos, alquenoilos y alquinilos de cadena lineal, ramificada y cíclica. Los grupos alifáticos pueden tener, por ejemplo, 5 a aproximadamente 50, 6 a aproximadamente 50, 8 a aproximadamente 50, o 10 a aproximadamente 50 átomos de carbono. Los grupos alifáticos de ejemplo incluyen undecilo, dodecilo, hexadecilo, heptadecilo, octadecilo, nonadecilo, terpenos, bornilo, adamantilo, derivados de estos y similares. En algunas modalidades, uno o más átomos de carbono en el grupo alifático pueden reemplazarse por un heteroátomo tal como O, S o N (por ejemplo, geraniloxihexilo). Otras porciones de conjugados lipófilos adecuados incluyen derivados alifáticos de gliceroles tales como alquilgliceroles, bis(alquil)gliceroles, tris(alquil)gliceroles, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos. En algunas modalidades, el conjugado lipófilo es di-hexildecil-rac-glicerol o 1,2-di-O-hexildecil-rac-glicerol (Manoharan y otros, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651; Shea y otros, Nuc. Acids Res., 1990, 18, 3777) o fosfonatos de estos. Las funcionalidades grasas saturadas e insaturadas, tales como, por ejemplo, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres grasos y amins grasas, también pueden servir como porciones de conjugados lipófilos. En algunas modalidades, las funcionalidades grasas pueden contener de aproximadamente 6 carbonos a aproximadamente 30 o de aproximadamente 8 a aproximadamente 22 carbonos. Los ácidos grasos de ejemplo incluyen ácido cáprico, caprílico, láurico, palmítico, mirístico, esteárico, oleico, linoleico, linoléico, araquidónico, eicosanoico y similares.

En modalidades adicionales, los grupos de conjugados lipófilos pueden ser grupos aromáticos policíclicos que tienen de 6 a aproximadamente 50, de 10 a aproximadamente 50, o de 14 a aproximadamente 40 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos aromáticos policíclicos incluyen pirenos, purinas, acridinas, xantenos, fluorenos, fenantrenos, antracenos, quinolinas, isoquinolinas, naftaleno, derivados de estos y similares. Otras porciones de conjugados lipófilos adecuados incluyen mentoles, tritilos (por ejemplo, dimetoxitritilo (DMT)), fenoxazinas, ácido lipoico, fosfolípidos, éteres, tioéteres (por ejemplo, hexil-S-tritiltiol), derivados de estos y similares. La preparación de conjugados lipófilos de compuestos oligoméricos está bien descrita en la técnica, tal como en, por ejemplo, Saison-Behmoaras y otros, EMBO J., 1991, 10, 1111; Kabanov y otros, FEBS Lett., 1990, 259, 327; Svinarchuk y otros, Biochimie, 1993, 75, 49.; (Mishra y otros, Biochim. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229, y Manoharan y otros, Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651).

Los compuestos oligoméricos que contienen porciones de conjugados con afinidad por la lipoproteína de baja densidad (LDL) pueden ayudar a proporcionar un sistema eficaz de suministro dirigido. Los altos niveles de expresión de los receptores de LDL en las células tumorales hacen que LDL sea un portador atractivo para el suministro selectivo de fármacos a estas células (Rump, y otros, Bioconjugate Chem., 1998, 9, 341; Firestone, Bioconjugate Chem., 1994, 5, 105;

Mishra y otros, *Biochim. Biophys. Acta*, 1995, 1264, 229). Las porciones que tienen afinidad por LDL incluyen muchos grupos lipófilos tales como esteroides (por ejemplo, colesterol), ácidos grasos, derivados de estos y combinaciones de estos. En algunas modalidades, las porciones de conjugados que tienen afinidad por LDL pueden ser ésteres dioleilo de ácido cólico tales como ácido quenodesoxicólico y ácido litocólico.

En algunas modalidades, los conjugados lipófilos pueden ser o pueden comprender biotina. En algunas modalidades, el conjugado lipófilo puede ser o puede comprender un glicérido o un éster de glicérido.

Los conjugados lipófilos, tales como los esteroides, los estanoles y las estaínas, tal como colesterol o como se describe en la presente descripción, pueden usarse para mejorar el suministro del oligonucleótido, por ejemplo, al hígado (típicamente hepatocitos).

En una modalidad preferida de la invención la porción de conjugado del conjugado de oligonucleótidos antisentido comprende o consiste en Conj 5, 5a, 6 o 6a. Con la máxima preferencia, la porción de conjugado comprende o consiste en Conj 5a.

En otra modalidad preferida, el conjugado de oligonucleótidos antisentido se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NO 10 y 11.

Las siguientes referencias también se refieren al uso de conjugados lipófilos: Kobylanska y otros, *Acta Biochim Pol.* (1999); 46(3): 679 - 91. Felber y otros. *Biomaterials* (2012) 33(25): 599-65); Grijalvo y otros, *J Org Chem* (2010) 75(20): 6806 - 13. Koufaki y otros, *Curr Med Chem* (2009) 16(35): 4728-42. Godeau y otros *J. Med. Chem.* (2008) 51(15): 4374-6.

Enlazadores (por ejemplo, Región B o Y)

Un enlace o enlazador es una conexión entre dos átomos que une un grupo químico o segmento de interés a otro grupo químico o segmento de interés a través de uno o más enlaces covalentes. Las porciones de conjugado (o porciones de direccionamiento o bloque) pueden unirse al compuesto oligomérico directamente o a través de una porción de enlace (enlazador o conector) - un enlazador. Los enlazadores son porciones bifuncionales que sirven para conectar covalentemente una tercera región, por ejemplo, una porción de conjugado, a un compuesto oligomérico (tal como a la región A). En algunas modalidades, el enlazador comprende una estructura de cadena o un oligómero de unidades repetitivas tales como unidades de etilenglicol o aminoácidos. El enlazador puede tener al menos dos funcionalidades, una para unirse al compuesto oligomérico y la otra para unirse a la porción de conjugado. Las funcionalidades del enlazador de ejemplo pueden ser electrofílicas para reaccionar con grupos nucleofílicos en el oligómero o porción de conjugado, o nucleofílicas para reaccionar con grupos electrofílicos. En algunas modalidades, las funcionalidades del enlazador incluyen amino, hidroxilo, ácido carboxílico, tiol, fosforamidato, fosforotioato, fosfato, fosfito, insaturaciones (por ejemplo, enlaces dobles o triples) y similares. Algunos enlazadores de ejemplo incluyen ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico (ADO), 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-l-carboxilato de succinimidilo (SMCC), ácido 6- amino hexanoico (AHX o AHA), 6-aminoheptoxi, ácido 4-aminobutírico, ácido 4-aminociclohexilcarboxílico, 4-(N-maleimidometil)ciclohexano- l-carboxi-(6-amido-caproato) de succinimidilo (LCSMCC), m-maleimido-benzoilato de succinimidilo (MBS), N-e-maleimido-caproilato de succinimidilo (EMCS), 6-(beta - maleimido-propionamido) hexanoato de succinimidilo (SMPH), N-(a-maleimido acetato) de succinimidilo (AMAS), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), beta-alanina (beta -ALA), fenilglicina (PHG), ácido 4-aminociclohexanoico (ACHC), beta - (ciclopropil) alanina (beta - CYPR), ácido amino dodecanoico (ADC), dioles de alifeno, polietilenglicoles, aminoácidos y similares.

En la técnica se conoce una amplia variedad de grupos enlazadores adicionales que pueden ser útiles en la unión de porciones de conjugados a compuestos oligoméricos. Puede encontrarse una revisión de muchos de los grupos enlazadores útiles en, por ejemplo, *Antisense Research and Applications*, S. T. Croke y B. Lebleu, Eds., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993, p. 303-350. Se ha usado un enlace disulfuro para unir el extremo 3' de un oligonucleótido a un péptido (Corey, y otros, *Science* 1987, 238, 1401; Zuckermann, y otros, *J Am. Chem. Soc.* 1988, 110, 1614; y Corey y otros, *J Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 8524). Nelson y otros, *Nuc. Acids Res.* 1989, 17, 7187 describen un reactivo de enlace para unir biotina al extremo 3' de un oligonucleótido. Este reactivo, N-Fmoc-O-DMT-3 -amino- 1,2-propanodiol está disponible comercialmente en Clontech Laboratories (Palo Alto, California) con el nombre de 3'-Amina. También está disponible comercialmente con el nombre de reactivo modificador de 3'-amino de Glen Research Corporation (Sterling, Virginia). Este reactivo también se utilizó para unir un péptido a un oligonucleótido según lo informado por Judy, y otros, *Tetrahedron Letters* 1991, 32, 879. Un reactivo comercial similar para la unión al extremo 5'-terminal de un oligonucleótido es C6 modificador de 5'-amino. Estos reactivos están disponibles en Glen Research Corporation (Sterling, Virginia). Estos compuestos o similares fueron utilizados por Krieg, y otros, *Antisense Research and Development* 1991, 1, 161 para unir fluoresceína al extremo 5'- terminal de un oligonucleótido. Otros compuestos tales como la acridina se han unido al grupo fosfato 3'-terminal de un oligonucleótido a través de un enlace de polimetileno (Asseline, y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1984, 81, 3297). Cualquiera de los grupos anteriores puede usarse como un enlazador único o en combinación con uno o más enlazadores adicionales.

Los enlazadores y su uso en la preparación de conjugados de compuestos oligoméricos se proporcionan en toda la técnica tal como en los documentos WO 96/11205 y WO 98/52614 y las patentes de Estados Unidos núms. 4,948,882; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,580,731; 5,486,603; 5,608,046; 4,587,044; 4,667,025; 5,254,469; 5,245,022;

5,112,963; 5,391,723; 5,510,475; 5,512,667; 5,574,142; 5,684,142; 5,770,716; 6,096,875; 6,335,432; y 6,335,437; WO 2012/083046.

5 Como se usa en la presente descripción, un enlace fisiológicamente lábil es un enlace lábil que puede escindirse en condiciones que normalmente se encuentran o son análogas a las encontradas dentro de un cuerpo de mamífero (también denominado un enlazador escindible, ilustrado como la región B en las figuras 12 y 13). Los grupos de enlace fisiológicamente lábiles se seleccionan de manera que experimenten una transformación química (por ejemplo, escisión) cuando están presentes en ciertas condiciones fisiológicas. Las condiciones intracelulares de los mamíferos incluyen condiciones químicas tales como pH, temperatura, condiciones o agentes oxidantes o reductores, y la concentración salina encontrada en o análoga a las encontradas en las células de mamíferos. Las condiciones intracelulares de mamíferos también incluyen la presencia de actividad enzimática normalmente presente en una célula de mamífero tal como de enzimas proteolíticas o hidrolíticas. En algunas modalidades, el enlazador escindible es susceptible a nucleasa(s) que puede(n) expresarse, por ejemplo, en la célula diana y - como tal, como se detalla en la presente descripción, el enlazador puede ser una región corta (por ejemplo, 1 - 10) nucleósidos unidos a fosfodiéster, tales como los nucleósidos de ADN.

20 La transformación química (escisión del enlace lábil) puede iniciarse mediante la adición de un agente farmacéuticamente aceptable a la célula o puede ocurrir espontáneamente cuando una molécula que contiene el enlace lábil alcanza un ambiente intracelular y/o extracelular apropiado. Por ejemplo, un enlace lábil al pH puede escindirse cuando la molécula ingresa a un endosoma acidificado. Por lo tanto, un enlace lábil al pH puede considerarse un enlace escindible endosómico. Los enlaces escindibles por enzimas pueden escindirse cuando se exponen a enzimas tales como las presentes en un endosoma o lisosoma o en el citoplasma. Un enlace disulfuro puede escindirse cuando la molécula ingresa al ambiente más reductor del citoplasma celular. Por lo tanto, un disulfuro puede considerarse un enlace escindible citoplasmático. Como se usa en la presente descripción, un enlace lábil al pH es un enlace lábil que se rompe selectivamente en condiciones ácidas (pH<7). Tales enlaces también pueden denominarse enlaces endosómicamente lábiles, ya que los endosomas y los lisosomas celulares tienen un pH inferior a 7.

#### *Conjugados bioescindibles unidos a oligómeros*

30 El compuesto oligomérico puede comprender, opcionalmente, una segunda región (región B) que se coloca entre el oligómero (denominado región A) y el conjugado (denominado región C). Ver las Figuras 12 y 13 para las ilustraciones). La región B puede ser un enlazador tal como un enlazador escindible (también denominado enlace fisiológicamente lábil). Enlaces lábiles fisiológicos susceptibles a nucleasas: En algunas modalidades, el oligómero (también denominado compuesto oligomérico) de la invención (o conjugado) comprende tres regiones:

- 35
- i) una primera región (región A), que comprende 16 - 18 nucleótidos contiguos;
  - ii) una segunda región (región B), que comprende un enlazador bioescindible
  - 40 iii) una tercera región (C) que comprende una porción de conjugado, una porción de direccionamiento, una porción de activación, en donde la tercera región está unida covalentemente a la segunda región.

45 En algunas modalidades, la región B puede ser un enlazador de nucleótidos fosfato. Por ejemplo, tales enlazadores pueden usarse cuando el conjugado es un conjugado lipófilo, como un lípido, un ácido graso, un esteroil, tal como el colesterol o el tocoferol. Los enlazadores de nucleótidos fosfato también pueden usarse para otros conjugados, por ejemplo conjugados de carbohidratos, tales como GalNAc.

#### *Enlazadores peptídicos*

50 En algunas modalidades, el enlazador bioescindible (región B) es un péptido, tal como un enlazador peptídico de trilisina que puede usarse en un conjugado de poliGalNAc, tal como un conjugado de triGalNAc. Ver también los péptidos birradicales mencionados en la presente descripción.

Otros enlazadores conocidos en la técnica que pueden usarse, incluyen enlazadores de disulfuro.

#### *Enlazadores de nucleótidos fosfato*

60 En algunas modalidades, la región B comprende entre 1 - 6 nucleótidos, que están unidos covalentemente al nucleótido 5' o 3' de la primera región, tal como a través de un grupo de enlace internucleósidos tal como un enlace fosfodiéster, en donde

- a. el enlace internucleosídico entre la región primera y segunda es un enlace fosfodiéster y el nucleósido de la segunda región [tal como inmediatamente]adyacente a la primera región es ADN o ARN; y/o
- 65 b. al menos 1 nucleósido de la segunda región es un nucleósido de ADN o ARN unido a fosfodiéster;

En algunas modalidades, la región A y la región B forman una única secuencia nucleotídica contigua de 12 - 22 nucleótidos de longitud.

5 En algunos aspectos el enlace internucleosídico entre las regiones primera y segunda puede considerarse parte de la segunda región.

10 En algunas modalidades, hay un grupo de enlace que contiene fósforo entre la segunda y la tercera región. El grupo fosfórico de enlace puede ser, por ejemplo, un fosfato (fosfodiéster), un fosforotioato, un fosforoditioato o un grupo boranofosfato. En algunas modalidades, este grupo de enlace que contiene fósforo se coloca entre la segunda región y una región enlazadora que está unida a la tercera región. En algunas modalidades, el grupo fosfato es un fosfodiéster.

15 Por lo tanto, en algunos aspectos el compuesto oligomérico comprende al menos dos grupos fosfodiéster, en donde al menos uno es de acuerdo con la declaración de invención anterior, y el otro se coloca entre las regiones segunda y tercera, opcionalmente entre un grupo enlazador y la segunda región.

20 En algunas modalidades, la tercera región es un grupo de activación, tal como un grupo de activación para uso en la conjugación. A este respecto, la invención también proporciona oligómeros activados que comprenden la región A y B y un grupo de activación, por ejemplo, un producto intermedio que es adecuado para la unión posterior a la tercera región, tal como adecuado para la conjugación.

25 En algunas modalidades, la tercera región es un grupo reactivo, tal como un grupo reactivo para su uso en la conjugación. A este respecto, la invención también proporciona oligómeros que comprenden la región A y B y un grupo reactivo, por ejemplo, un producto intermedio que es adecuado para la unión posterior a la tercera región, tal como adecuado para la conjugación. El grupo reactivo puede, en algunas modalidades comprender una amina del grupo alcohol, tal como un grupo amina.

30 En algunas modalidades la región A comprende al menos uno, tal como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o 21 enlaces internucleosídicos distintos de fosfodiéster, tales como enlaces internucleosídicos que (opcionalmente independientemente) se seleccionan del grupo que consiste en fosforotioato, fosforoditioato y boranofosfato, y metilfosfonato, tal como fosforotioato. En algunas modalidades la región A comprende al menos un enlace fosforotioato. En algunas modalidades al menos el 50 %, tal como al menos el 75 %, tal como al menos el 90 % de los enlaces internucleosídicos, tal como todos los enlaces internucleosídicos dentro de la región A, son distintos del fosfodiéster, por ejemplo, son enlaces fosforotioato. En algunas modalidades, todos los enlaces internucleosídicos en la región A son distintos de fosfodiéster.

35 En algunas modalidades, el compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido antisentido, tal como un conjugado de oligonucleótidos antisentido. El oligonucleótido antisentido puede ser o puede comprender la primera región, y opcionalmente la segunda región. A este respecto, en algunas modalidades, la región B puede formar parte de una secuencia de nucleobases contigua que es complementaria a la diana (ácido nucleico). En otras modalidades, la región B puede carecer de complementariedad con la diana.

45 Alternativamente, en algunas modalidades, la invención proporciona un oligonucleótido no unido por fosfodiéster, tal como un oligonucleótido unido por fosforotioato (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) que tiene al menos un nucleósido de ADN o ARN terminal (5' y/o 3') unido al nucleósido adyacente del oligonucleótido a través de un enlace fosfodiéster, en donde el nucleósido de ADN o ARN terminal se une adicionalmente covalentemente a una porción de conjugado, una porción de direccionamiento o una porción de bloqueo, opcionalmente a través de una porción enlazador.

50 En algunas modalidades, el compuesto oligomérico comprende un oligonucleótido antisentido, tal como un conjugado de oligonucleótidos antisentido. El oligonucleótido antisentido puede ser o puede comprender la primera región, y opcionalmente la segunda región. A este respecto, en algunas modalidades, la región B puede formar parte de una secuencia de nucleobases contigua que es complementaria a la diana (ácido nucleico). En otras modalidades, la región B puede carecer de complementariedad con la diana.

55 En algunas modalidades, al menos dos nucleósidos consecutivos de la segunda región son nucleósidos de ADN (tal como al menos 3 o 4 o 5 nucleótidos de ADN consecutivos).

En una modalidad tal, el oligonucleótido de la invención puede describirse de acuerdo con la siguiente fórmula:

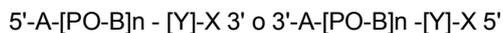
60 5'-A-PO-B [Y]X- 3' o 3'-A-PO-B [Y]X- 5'  
en donde A es la región A, PO es un enlace fosfodiéster, B es la región B, Y es un grupo de enlace opcional y X es un conjugado, un grupo de direccionamiento o de bloqueo o un grupo reactivo o de activación.

65 En algunas modalidades, la región B comprende 3'- 5' o 5'-3': i) un enlace fosfodiéster con el nucleósido 5' o 3' de la región A, ii) un nucleósido de ADN o ARN, tal como un nucleósido de ADN, y iii) un enlace fosfodiéster adicional

5'-A-PO-B - PO- 3' o 3'-A-PO-B - PO- 5'

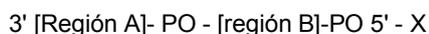
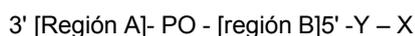
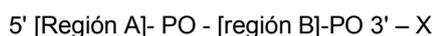
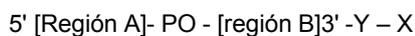
El enlace fosfodiéster adicional une el nucleósido de la región B con uno o más nucleósidos adicionales, tales como uno o más nucleósidos de ADN o ARN, o puede unirse a X (es un conjugado, un grupo de direccionamiento o de bloqueo o un grupo reactivo o de activación) opcionalmente a través de un grupo de enlace (Y).

5 En algunas modalidades, la región B comprende 3'- 5' o 5'-3': i) un enlace fosfodiéster con el nucleósido 5' o 3' de la región A, ii) entre 2 - 10 nucleósidos unidos a fosfodiéster de ADN o ARN, tales como un nucleósido de ADN, y opcionalmente iii) un enlace fosfodiéster adicional:



En donde A representa la región A, [PO-B]<sub>n</sub> representa la región B, en donde n es 1 - 10, tal como 1, 2, 3,4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10, PO es un grupo de enlace fosfodiéster opcional entre la región B y X (o Y si está presente).

15 En algunas modalidades la invención proporciona compuestos de acuerdo con (o que comprenden) una de las siguientes fórmulas:



35 La región B, por ejemplo, puede comprender o consistir en:



60 Debe reconocerse que los enlazadores bioescindible unidos a fosfato pueden emplear nucleósidos distintos de ADN y ARN. Los enlazadores de nucleótidos bioescindibles pueden identificarse mediante el uso de los ensayos del ejemplo 6. En algunas modalidades, el compuesto de la invención comprende un enlazador bioescindible (también denominado enlazador fisiológicamente lábil, enlaces lábiles fisiológicos susceptibles a nucleasas o enlazador susceptible a nucleasa), por ejemplo, el enlazador fosfato de nucleótidos (tal como la región B) o un enlazador peptídico, que une el oligómero (o secuencia nucleotídica contigua o región A), a una porción de conjugado (o región C).

65 La susceptibilidad a la escisión en los ensayos mostrados en el Ejemplo 6 puede usarse para determinar si un enlazador es bioescindible o fisiológicamente lábil.

Los enlazadores bioescindibles de acuerdo con la presente invención se refieren a enlazadores que son susceptibles a escisión en un tejido diana (es decir, fisiológicamente lábiles), por ejemplo, hígado y/o riñón. Se prefiere que la tasa de escisión observada en el tejido diana sea mayor que la encontrada en el suero sanguíneo. Los métodos adecuados para determinar el nivel (%) de escisión en el tejido (por ejemplo, hígado o riñón) y en suero se encuentran en el ejemplo 6. En algunas modalidades, el enlazador bioescindible (también denominado enlazador fisiológicamente lábil, o enlazador susceptible a nucleasas), tal como la región B, en un compuesto de la invención, está al menos aproximadamente 20 % escindido, tal como al menos aproximadamente 30 % escindido, tal como al menos aproximadamente 40 % escindido, tal como al menos aproximadamente 50 % escindido, tal como al menos aproximadamente 60 % escindido, tal como al menos aproximadamente 70 % escindido, tal como al menos aproximadamente 75 % escindido, en el ensayo de homogeneizado de hígado o riñón del Ejemplo 6. En algunas modalidades, la escisión (%) en suero, como se usa en el ensayo en el Ejemplo 6, es menor que aproximadamente 30 %, menor de aproximadamente 20 %, tal como menor que aproximadamente 10 %, tal como menor que 5 %, tal como menor que aproximadamente 1 %.

En algunas modalidades, que pueden ser iguales o diferentes, el enlazador bioescindible (también denominado enlazador fisiológicamente lábil o enlazador susceptible a nucleasas), tal como la región B, en un compuesto de la invención, es susceptible a la escisión por la nucleasa S1. La susceptibilidad a la escisión por S1 puede evaluarse mediante el uso del ensayo de nucleasa S1 mostrado en el Ejemplo 6. En algunas modalidades, el enlazador bioescindible (también denominado enlazador fisiológicamente lábil, o enlazador susceptible a nucleasas), tal como la región B, en un compuesto de la invención, está al menos aproximadamente 30 % escindido, tal como al menos aproximadamente 40 % escindido, tal como al menos aproximadamente 50 % escindido, tal como al menos aproximadamente 60 % escindido, tal como al menos aproximadamente 70 % escindido, tal como al menos aproximadamente 80 % escindido, tal como al menos aproximadamente 90 % escindido, tal como al menos 95 % escindido después de 120 minutos de incubación con nucleasa S1 de acuerdo con el ensayo usado en el Ejemplo 6.

Selección de secuencia en la segunda región:

En algunas modalidades, la región B no forma una secuencia complementaria cuando la región oligonucleotídica A y B está alineada con la secuencia diana complementaria.

En algunas modalidades, la región B forma una secuencia complementaria cuando la región oligonucleotídica A y B está alineada con la secuencia diana complementaria. A este respecto, las regiones A y B juntas pueden formar una única secuencia contigua que es complementaria a la secuencia diana.

En algunas modalidades, la secuencia de bases en la región B se selecciona para proporcionar un sitio de escisión por endonucleasa óptimo, basado en las enzimas de escisión endonucleasas predominantes presentes en el tejido o célula diana o compartimento subcelular. A este respecto, al aislar extractos celulares de tejidos diana y tejidos no diana, las secuencias de escisión de endonucleasa para su uso en la región B pueden seleccionarse en base a una actividad de escisión preferencial en la célula diana deseada (por ejemplo, hígado/hepatocitos) en comparación con una célula no diana (por ejemplo, riñón). A este respecto, la potencia del compuesto para la regulación negativa diana puede optimizarse para el tejido/célula deseada.

En algunas modalidades, la región B comprende un dinucleótido de secuencia AA, AT, AC, AG, TA, TT, TC, TG, CA, CT, CC, CG, GA, GT, GC o GG, en donde C puede ser 5-metilcitosina y/o T pueden reemplazarse con U. En algunas modalidades, la región B comprende un trinucleótido de secuencia AAA, AAT, AAC, AAG, ATA, ATT, ATC, ATG, ACA, ACT, ACC, ACG, AGA, AGT, AGC, AGG, TAA, TAT, TAC, TAG, TTA, TTT, TTC, TAG, TCA, TCT, TCC, TCG, TGA, TGT, TGC, TGG, CAA, CAT, CAC, CAG, CTA, CTG, CTC, CTT, CCA, CCT, CCC, CCG, CGA, CGT, CGC, CGG, GAA, GAT, GAC, CAG, GTA, GTT, GTC, GTG, GCA, GCT, GCC, GCG, GGA, GGT, GGC y GGG en donde C puede ser 5-metilcitosina y/o T puede reemplazarse con U. En algunas modalidades, la región B comprende un tetranucleótido de secuencia AAAX, AATX, AACX, AAGX, ATAX, ATTX, ATCX, ATGX, ACAX, ACTX, ACCX, ACGX, AGAX, AGTX, AGCX, AGGX, TAAX, TATX, TACX, TAGX, TTAX, TTTX, TTCX, TAGX, TCAX, TCTX, TCCX, TCGX, TGAX, TGTX, TGXX, TGGX, CAAX, CATX, CACX, CAGX, CTAG, CTGX, CTCX, CTTX, CCAX, CCTX, CCCX, CCGX, CGAX, CGTX, CGCX, CGGX, GAAX, GATX, GACX, CAGX, GTAX, GTTX, GTCX, GTGX, GCAX, GCTX, GCCX, GCGX, GGAX, GGTX, GGCX y GGGX, en donde X puede seleccionarse del grupo que consiste en A, T, U, G, C y análogos de estos, en donde C puede ser 5-metilcitosina y/o T puede reemplazarse con U. Se reconocerá que cuando se hace referencia a las nucleobases (de origen natural) A, T, U, G, C, estas pueden sustituirse con análogos de nucleobase que funcionan como la nucleobase natural equivalente (por ejemplo, un par de bases con el nucleósido complementario). En algunas modalidades, la región B no comprende una T o U.

*Productos intermedios aminoalquilo*

Se describen productos intermedios de oligómero de LNA que comprenden un oligómero de LNA antisentido que comprende un enlazador de aminoalquilo (por ejemplo, terminal, 5' o 3'), tal como un grupo aminoalquilo C2 - C36, por ejemplo un grupo aminoalquilo C6 a C12, que incluye para ejemplo grupos aminoalquilo C6 y C12. El grupo aminoalquilo puede añadirse al oligómero de LNA como parte de la síntesis estándar de oligonucleótidos, por ejemplo mediante el uso de una aminoalquil fosforamida (por ejemplo, protegida). El grupo de enlace entre el aminoalquilo y el oligómero de LNA puede ser, por ejemplo, un fosforotioato o un fosfodiéster, o uno de los otros grupos de enlace de nucleósidos a los que

se hace referencia en la presente descripción, por ejemplo. El grupo aminoalquilo puede estar unido covalentemente a, por ejemplo, el 5' o 3' del oligómero de LNA, tal como por el grupo de enlace de nucleósido, tal como el enlace fosforotioato o fosfodiéster.

5 Se describe un método de síntesis del oligómero de LNA que comprende la síntesis secuencial del oligómero de LNA, tal como la síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, que comprende la etapa de añadir un grupo aminoalquilo al oligómero, tal como, por ejemplo, durante la primera o la última ronda de síntesis de oligonucleótidos. El método de síntesis puede comprender además la etapa de hacer reaccionar el conjugado con el aminoalquilo-oligómero de LNA (la etapa de conjugación). El conjugado puede comprender enlazadores adecuados y/o grupos de puntos de ramificación, y  
10 opcionalmente grupos conjugados adicionales, tales como grupos hidrófobos o lipófilos, como se describe en la presente descripción. La etapa de conjugación puede realizarse mientras el oligómero está unido al soporte sólido (por ejemplo, después de la síntesis de oligonucleótidos, pero antes de la elución del oligómero del soporte sólido), o posteriormente (es decir, después de la elución). Se describe el uso de un enlazador aminoalquilo en la síntesis del oligómero de la invención.

15 Método de fabricación/síntesis

Se describe un método para sintetizar (o fabricar) un compuesto oligomérico, tal como el compuesto oligomérico de la invención, dicho método comprende  
20 ya sea:

) una etapa para proporcionar un soporte de síntesis de oligonucleótidos [fase sólida] al que se une uno de los siguientes [tercera región]:

25 i) un grupo enlazador (-Y-)

ii) un grupo seleccionado del grupo que consiste en un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, un grupo reactivo [por ejemplo, una amina o un alcohol] o un grupo de activación (X-)

30 iii) un grupo -Y - X

y

35 b) una etapa de síntesis de oligonucleótidos[secuencial] de la región B seguido de la región A,

y / o:

c) una etapa de síntesis de oligonucleótidos[secuencial] de una primera región (A) y una segunda región (B), en donde la etapa de síntesis es seguida por

40 d) una etapa de añadir una tercera región [que comprende fosforamidita]

i) un grupo enlazador (-Y-)

45 ii) un grupo seleccionado del grupo que consiste en un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, un grupo reactivo [por ejemplo, una amina o un alcohol] o un grupo de activación (X-)

iii) un grupo -Y - X

50 seguido por

e) la escisión del compuesto oligomérico del soporte [fase sólida]

en donde, opcionalmente, dicho método comprende además una etapa adicional seleccionada de:

55 f) en donde el tercer grupo es un grupo de activación, la etapa de activar el grupo de activación para producir un grupo reactivo, seguido de la adición de un conjugado, un grupo de bloqueo o de direccionamiento al grupo reactivo, opcionalmente a través de un grupo enlazador (Y);

60 g) en donde la tercera región es un grupo reactivo, la etapa de añadir un conjugado, un grupo de bloqueo o de direccionamiento al grupo reactivo, opcionalmente a través de un grupo enlazador (Y).

h) en donde la tercera región es un grupo enlazador (Y), la etapa de añadir un conjugado, un grupo de bloqueo o de direccionamiento al grupo enlazador (Y)

65

en donde las etapas f), g) o h) se realizan antes o después de la escisión del compuesto oligomérico del soporte de síntesis de oligonucleótidos. El método puede realizarse mediante el uso de la química estándar de fosforamidita, y como tal la región X y/o la región X o la región X e Y pueden proporcionarse, antes de la incorporación en el oligómero, como una fosforamidita. Ver las figuras 5 a 10 que ilustran aspectos no limitantes del método de la invención.

5

Se describe un método para sintetizar (o fabricar) un compuesto oligomérico, tal como el compuesto oligomérico de la invención, dicho método comprende

10

una etapa de síntesis secuencial de oligonucleótidos de una primera región (A) y una segunda región (B), en donde la etapa de síntesis es seguida por una etapa de añadir una tercera región fosforamidita que comprende la región X (también denominada región C) o Y, tal como una región que comprende un grupo seleccionado del grupo que consiste en un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo de bloqueo, un grupo funcional, un grupo reactivo (por ejemplo, una amina o un alcohol) o un grupo de activación (X), o un grupo -Y - X seguido de la escisión del compuesto oligomérico del soporte [fase sólida].

15

Sin embargo, se reconoce que la región X o X-Y puede añadirse después de la escisión desde el soporte sólido. Alternativamente, el método de síntesis puede comprender las etapas de sintetizar una primera (A), y opcionalmente una segunda región (B), seguido de la escisión del oligómero del soporte, con una etapa posterior de añadir una tercera región, tal como grupo X o X-Y al oligómero. La adición de la tercera región puede lograrse, por ejemplo, al añadir una unidad de amino fosforamidita en la etapa final de síntesis de oligómeros (en el soporte), que puede, después de la escisión del soporte, usarse para unirse a grupo X o X-Y, opcionalmente a través de un grupo de activación en el grupo X o Y (cuando está presente). En las modalidades en las que el enlazador escindible no es una región de nucleótidos, la región B puede ser un enlazador escindible no nucleotídico, por ejemplo, un enlazador peptídico, que puede formar parte de la región X (también denominada región C) o ser la región Y (o parte de esta).

20

En algunos ejemplos descritos en la presente descripción, la región X (tal como C) o (X-Y), tal como el conjugado (por ejemplo, un conjugado de GalNAc) comprende un grupo de activación (un grupo funcional activado) y en el método de síntesis el conjugado activado (o la región x, o X-Y) se añade a las regiones primera y segunda, tal como un oligómero unido a amino. El grupo amino puede añadirse al oligómero mediante química de fosforamidita estándar, por ejemplo, como la etapa final de la síntesis de oligómero (que típicamente dará como resultado un grupo amino en el extremo 5' del oligómero). Por ejemplo, durante la última etapa de la síntesis de oligonucleótidos, se usa una fosforamidita de aminoalquilo protegida, por ejemplo, una fosforamidita de TFA-aminoC6 (6-(Trifluoroacetilamino)-hexil-(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)-fosforamidita).

25

La región X (o la región C como se denomina en la presente descripción), tal como el conjugado (por ejemplo, un conjugado de GalNAc) puede activarse mediante el método de éster de NHS y después se añade el oligómero unido a amino. Por ejemplo, puede usarse una N-hidroxisuccinimida (NHS) como grupo activador para la región X (o región C, tal como un conjugado, tal como una porción de conjugado de GalNAc).

30

Se describe un oligómero preparado mediante el método de la invención.

35

En algunos ejemplos, la región X y/o la región X o la región X e Y pueden unirse covalentemente (enlazarse) a la región B a través de un enlace de nucleósido de fosfato, tales como los descritos en la presente descripción, que incluyen fosfodiéster o fosforotioato, o mediante un grupo alternativo, tal como como un grupo triazol.

40

En algunos ejemplos, el enlace internucleosídico entre la región primera y segunda es un fosfodiéster unido al primer (o único) nucleósido de ADN o ARN de la segunda región, o la región B comprende al menos un nucleósido de ADN o ARN unido a fosfodiéster.

45

La segunda región puede, en algunos ejemplos, comprender nucleósidos de ADN o ARN adicionales que pueden estar unidos por fosfodiéster. La segunda región además está unida covalentemente a una tercera región que puede ser, por ejemplo, un conjugado, un grupo de direccionamiento, un grupo reactivo y/o un grupo de bloqueo.

50

Se describe en la presente descripción, además, una región lábil, la segunda región, que une la primera región, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, y un grupo de conjugado o funcional, por ejemplo, un grupo de direccionamiento o de bloqueo. La región lábil comprende al menos un nucleósido unido a fosfodiéster, tal como un nucleósido de ADN o ARN, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleósidos unidos a fosfodiéster, tal como ADN o ARN. En algunas modalidades, el compuesto oligomérico comprende un enlazador escindible (lábil). A este respecto, el enlazador escindible está presente preferentemente en la región B (o en algunas modalidades, entre la región A y B).

55

Alternativamente, en algunas modalidades, la invención proporciona un oligonucleótido no unido por fosfodiéster, tal como un oligonucleótido unido a fosforotioato (por ejemplo, un oligonucleótido antisentido) que tiene al menos un nucleósido de ADN o ARN terminal (5' y/o 3') unido al nucleósido adyacente del oligonucleótido a través de un enlace fosfodiéster, en donde el nucleósido de ADN o ARN terminal se une adicionalmente covalentemente a una porción de conjugado, una porción de direccionamiento o una porción de bloqueo, opcionalmente a través de una porción enlazador.

60

## Composiciones

5 El oligómero o los conjugados de oligómero de la invención pueden usarse en formulaciones y composiciones farmacéuticas. Adecuadamente, tales composiciones comprenden un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El documento WO2007/031091 proporciona un diluyente, portador y adyuvantes farmacéuticamente aceptables adecuados y preferidos. Las dosificaciones, formulaciones, vías de administración, composiciones, formas de dosificación, combinaciones con otros agentes terapéuticos, formulaciones de profármacos adecuadas también se proporcionan en el documento WO2007/031091.

## 10 Aplicaciones

Los oligómeros o conjugados de oligómero de la invención pueden utilizarse como reactivos de investigación para, por ejemplo, diagnósticos, terapias y profilaxis.

15 En la investigación, tales oligómeros pueden usarse para inhibir específicamente la síntesis de la proteína PCSK9 (típicamente degradando o inhibiendo el ARNm y, por lo tanto, evitando la formación de proteínas) en células y animales experimentales, facilitando de este modo el análisis funcional de la diana o una evaluación de su utilidad como una diana de intervención terapéutica.

20 En el diagnóstico, los oligómeros pueden usarse para detectar y cuantificar la expresión de PCSK9 en células y tejidos mediante transferencia Northern, hibridación *in situ* o técnicas similares.

25 Se describen métodos de tratamiento de un mamífero, tales como tratamiento de un ser humano, sospechoso de tener o de ser propenso a una enfermedad o afección, asociada con la expresión de PCSK9 mediante la administración de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de uno o más de los oligómeros o composiciones de invención. El oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención es típicamente para administración en una cantidad eficaz.

30 La invención también proporciona el uso del compuesto o conjugado de la invención como se describe para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno como se menciona en la presente descripción.

35 Se describe además un método para tratar un trastorno como se menciona en la presente descripción, dicho método que comprende administrar un compuesto de acuerdo con la invención como se describe en la presente descripción, y/o un conjugado de acuerdo con la invención, y/o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención a un paciente que lo necesita.

## Indicaciones médicas

40 Los oligómeros, conjugados de oligómeros y otras composiciones de acuerdo con la invención pueden usarse para el tratamiento de afecciones asociadas con sobreexpresión o expresión de versión mutada de PCSK9.

La invención proporciona además el uso de un compuesto de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección como se menciona en la presente descripción.

45 Se describe un método para tratar a un mamífero que padece o es susceptible a afecciones asociadas con niveles y/o actividad anormales de PCSK9, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligómero o conjugado de oligómero dirigido a PCSK9 que comprende una o más unidades de LNA. El oligómero, un conjugado o una composición farmacéutica de acuerdo con la invención se administra típicamente en una cantidad eficaz.

50 La enfermedad o trastorno, como se menciona en la presente descripción, puede, en algunas modalidades, estar asociado con una mutación en el gen de PCSK9 o un gen cuyo producto proteico está asociado o interactúa con PCSK9. Por lo tanto, en algunas modalidades, el ARNm diana es una forma mutada de la secuencia de PCSK9.

55 Un aspecto interesante de la invención está dirigido al uso de un oligómero (compuesto) de la invención o un conjugado de la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o afección como se menciona en la presente descripción.

60 Los métodos descritos en la presente descripción se emplean preferentemente para el tratamiento o la profilaxis contra enfermedades provocadas por niveles y/o actividad anormales de PCSK9.

Se describe un método para tratar niveles y/o actividad anormales de PCSK9, dicho método comprende administrar un oligómero de la invención, o un conjugado de la invención o una composición farmacéutica de la invención a un paciente que lo necesite.

65 La invención también se refiere al oligómero de la invención, la composición farmacéutica de la invención o el conjugado de la invención para el uso como un medicamento.

La invención se refiere además al uso de un compuesto, composición o un conjugado a partir de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de niveles y/o actividad anormales de PCSK9 o la expresión de formas mutantes de PCSK9 (tales como variantes alélicas, tales como las asociadas con una de las enfermedades mencionadas en la presente descripción).

Se describe un método para tratar a un sujeto que padece una enfermedad o afección como la mencionada en la presente descripción.

Un paciente que necesita tratamiento es un paciente que padece o es probable que padezca de la enfermedad o trastorno.

En algunos ejemplos, el término "tratamiento", como se usa en la presente descripción, se refiere tanto al tratamiento de una enfermedad existente (*por ejemplo*, una enfermedad o trastorno como se menciona en la presente descripción), o la prevención de una enfermedad, *es decir*, la profilaxis. Por lo tanto, se reconocerá que el tratamiento como se menciona en la presente descripción puede, en algunos ejemplos, ser profiláctico.

En una modalidad, la invención se refiere al oligómero de la invención, el conjugado de oligonucleótido antisentido de la invención o la composición farmacéutica de la invención para el tratamiento de la hipercolesterolemia y trastornos relacionados, o métodos de tratamiento que usan tales compuestos o composiciones para tratar la hipercolesterolemia y trastornos relacionados, en donde el término "trastornos relacionados" cuando se refiere a hipercolesterolemia se refiere a una o más de las afecciones seleccionadas del grupo que consiste en: aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar *por ejemplo* mutaciones de ganancia de función en PCSK9, desequilibrio de colesterol asociado a HDL/LDL, dislipidemias, *por ejemplo*, hiperlipidemia familiar (FCHL) o hipercolesterolemia familiar (FHC), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, enfermedad arterial coronaria (CAD) y enfermedad cardíaca coronaria (CHD).

Tratamientos de combinación

En algunas modalidades, el oligómero de la invención, el conjugado de oligonucleótido antisentido de la invención o la composición farmacéutica de la invención es para su uso en un tratamiento combinado con otro agente terapéutico. Por ejemplo, los inhibidores de la HMG CoA reductasa, tales como las estatinas, por ejemplo, se usan ampliamente en el tratamiento de enfermedades metabólicas (ver el documento WO2009/043354, para ejemplos de tratamientos combinados). Los tratamientos combinados pueden ser otros compuestos reductores del colesterol, tal como un compuesto seleccionado del grupo que consiste en resinas secuestradoras de sales biliares (por ejemplo, colestiramina, colestipol y clorhidrato de colesevelam), inhibidores de la HMGCoA-reductasa (por ejemplo, lovastatina, cerivastatina, pravastatina, atorvastatina, simvastatina, rosuvastatina y fluvastatina), ácido nicotínico, derivados del ácido fibríco (por ejemplo, clofibrato, gemfibrozil, fenofibrato, bezafibrato y ciprofibrato), probucol, neomicina, dextrotiroxina, ésteres de estanoles vegetales, inhibidores de la absorción de colesterol (por ejemplo, ezetimiba), inhibidores de los transportadores de ácidos biliares (transportadores de ácidos biliares dependientes de sodio apical), reguladores del CYP7a hepático, terapias de reemplazo de estrógenos (por ejemplo, tamoxifeno) y antiinflamatorios (por ejemplo, glucocorticoides). Las combinaciones con estatinas pueden ser particularmente preferidas.

## EJEMPLOS

Los oligonucleótidos se sintetizaron sobre soportes universales de uridina mediante el uso del enfoque de fosforamidita en un sintetizador Expedite 8900/MOSS (Sistema de síntesis de oligonucleótidos múltiples) u Oligomaker 48 a escala de 4 o 1  $\mu\text{mol}$ , respectivamente. Al final de la síntesis, los oligonucleótidos se escindieron del soporte sólido mediante el uso de amoniaco acuoso durante 5-16 horas a 60 °C. Los oligonucleótidos se purificaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC) o mediante extracciones en fase sólida y se caracterizaron mediante UPLC, y la masa molecular se confirmó adicionalmente mediante ESI-MS. Ver abajo para más detalles.

### *Alargamiento del oligonucleótido*

El acoplamiento de  $\beta$ -cianoetil-fosforamiditas (enlazador ADN-A(Bz), ADN-G(ibu), ADN-C(Bz), ADN-T, LNA-5-metil-C(Bz), LNA-A(Bz), LNA-G (dmf), LNA-T o C6-SS-C6) se realiza mediante el uso de una solución de 0,1 M de la amidita protegida con 5'-O-DMT en acetonitrilo y DCI (4,5-dicianoimidazol) en acetonitrilo (0,25 M) como activador. Para el ciclo final, se usó una fosforamidita de colesterol unido a C6 disponible comercialmente a 0,1 M en DCM. La tiolación para la introducción de enlaces fosforotioato se lleva a cabo mediante el uso de hidruro de xantano (0,01 M en acetonitrilo/piridina 9:1). Los enlaces fosforodíéster se introducen mediante el uso de yodo 0,02 M en THF/piridina/agua 7: 2:1. La porción de los reactivos son los que se usan típicamente para la síntesis de oligonucleótidos. Para la conjugación de síntesis en fase sólida posterior, se usó una fosforamidita aminoenlazadora de C6 disponible comercialmente en el último ciclo de la síntesis en fase sólida y después de la desprotección y escisión del soporte sólido se aisló el oligonucleótido desprotegido aminoenlazado. Los conjugados se introdujeron mediante la activación del grupo funcional mediante el uso de métodos de síntesis estándar.

### *Purificación mediante RP-HPLC:*

Los compuestos brutos se purificaron mediante RP-HPLC preparativa en una columna Phenomenex Jupiter C18 10  $\mu$  150x10 mm. Se usó acetato de amonio 0,1 M pH 8 y acetonitrilo como tampones a una tasa de flujo de 5 ml/min. Las fracciones recolectadas se liofilizaron para dar el compuesto purificado típicamente como un sólido blanco.

5 *Abreviaturas:*

DCI:

4,5-dicianoimidazol

10

DCM:

Diclorometano

15

DMF:

Dimetilformamida

20

DMT:

4,4'-dimetoxitritilo

THF:

25

Tetrahidrofurano

Bz:

Benzoilo

30

Ibu:

Isobutirilo

35

RP-HPLC:

Cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa

Los compuestos sintetizados se muestran en la Tabla 1 y también se ilustran en las Figuras.

40

Ejemplo 1 Nuevo descubrimiento de motivos diana de PCSK9

Se diseñaron y sintetizaron 521 oligonucleótidos antisentido anti-PCSK9, todos con tres ácidos nucleicos bloqueados que flanquean diez ADN, es decir, con un diseño gap-mer de LNA de 16 mer - específico para PCSK9 humano y de primates.

45

La línea celular humana 15PC3 se incubó durante tres días con oligonucleótidos simulados o modificados con ácido nucleico bloqueado dirigidos a PCSK9 humano a una concentración de 0,3  $\mu$ M. Cada oligonucleótido anti-PCSK9 se probó en tres experimentos independientes. Los niveles de ARNm de PCSK9 se cuantificaron a partir del ARN extraído mediante el uso de PCR en tiempo real como se describe, y se presentaron normalizados con respecto al ARNm de  $\beta$ -actina y en relación con los niveles promedio en doce muestras tratadas de manera simulada en la figura 8, con un primer plano de un subconjunto de moléculas más potentes en la figura 9.

50

Ejemplo 2 inactivación in vitro de ARNm

La línea celular humana 15PC3 se incubó durante 3 días con oligonucleótidos simulados o modificados con ácido nucleico bloqueado con las SEQ ID 1 a 8 dirigidas a PCSK9 humano a concentraciones de 0,0012, 0,06, 0,3 y 1,5  $\mu$ M. Los niveles de ARNm de PCSK9 se cuantificaron a partir de ARN extraído mediante el uso de PCR en tiempo real como se describe, y se presentaron en relación con los niveles promedio en cuatro muestras tratadas de manera simulada en la figura 10. Para cada oligonucleótido, la potencia, cuantificada como la mitad de la concentración eficaz máxima (CE50), se determinó mediante el ajuste de los mínimos cuadrados de la ecuación de Hill en forma logística de dos parámetros con el límite inferior fijado en 0 % y el límite superior fijado en 100 %, como EC50 = estimado  $\pm$  desviación estándar.

60

Ejemplo 3 - niveles de ALT in vivo

Ratones NMRI hembras de cuatro semanas de edad (Taconic, Dinamarca), que pesaban aproximadamente 20 g al llegar, se inyectaron por vía intravenosa una vez con solución salina o con oligonucleótidos, conjugados con colesterol, modificados con ácido nucleico bloqueado, con las SEQ ID 9 a 16 dirigidos a PCSK9 humano a dosis de 7,5 y 15 mg/kg.

65

Los ratones se sacrificaron 7 días después de la administración y se determinaron los niveles séricos de alanina aminotransferasa (ALT) mediante el uso de un ensayo enzimático (Horiba ABX Diagnostics). Para cada grupo de tratamiento de cinco ratones, se calcularon la media y las desviaciones estándar y se presentan en la figura 11 en relación con los niveles medios en ratones tratados con solución salina. Se observaron aumentos de ALT a ambas concentraciones para algunas, pero no todas, las moléculas conjugadas a colesterol. Varios de los compuestos, tales como las SEQ ID NO 9 y 10, no mejoraron la ALT en ratones de una manera clínicamente significativa, incluso cuando el colesterol se usó como un conjugado para mejorar la absorción de compuestos en el hígado.

Ejemplo 4: Modelo de primate no humano

El objetivo principal de este estudio fue investigar marcadores lipídicos seleccionados durante 7 semanas después de una única inyección en bolo lenta de compuestos LNA anti-PCSK9 a monos cynomolgus y evaluar la posible toxicidad de los compuestos en mono. Los compuestos usados en este estudio fueron las SEQ ID NO 10 13, 18, 19, 20 y 21, preparadas en solución salina estéril (0,9 %) a una concentración inicial de 0,625 y 2,5 mg/ml).

Se usaron monos machos de al menos 24 meses de edad, y se les dio acceso libre al agua del grifo y se distribuyeron diariamente 180 g de dieta expandida SQC SHORT MWM (E) (Dietex France, SDS, Saint Gratien, France) por animal. La cantidad total de alimento distribuido en cada jaula se calculará de acuerdo con el número de animales en la jaula ese día. Además, se le dio fruta o verdura diariamente a cada animal. Los animales se aclimataron a las condiciones del estudio durante un período de al menos 14 días antes del comienzo del período de tratamiento. Durante este período, se realizaron investigaciones previas al tratamiento. A los animales se les administró una dosis por vía intravenosa a una dosis única de 0,25, 1,0 o 2,5 mg/kg (SEQ ID NO 10, 13, 18 y 21) o a una dosis única de 1,0 o 2,5 mg/kg (SEQ ID NO 19 y 20). El volumen de dosis fue de 0,4 ml/kg. Se usaron 2 animales por grupo.

Las formulaciones de dosis se administraron una vez el día 1. Los animales se observaron durante un período de 7 semanas después del tratamiento, y fueron liberados del estudio el día 51. El día 1 corresponde al primer día del período de tratamiento. Las observaciones clínicas y el peso corporal y la ingesta de alimentos (por grupo) se registrarán antes y durante el estudio.

Se tomaron muestras de sangre y se realizaron análisis en los siguientes puntos de tiempo:

Día del estudio	Parámetros
-8	RCP, L, Apo-B, PCSK9*, OA
-1	L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
1	Dosificación
4	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, OA
8	LSB, L, Apo-B, PCSK9*, PK, OA
15	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
22	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
29	L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
36	LSB, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
43	L, PK, Apo-B, PCSK9* PK, OA
50	RCP, L, Apo-B, PCSK9* PK, OA
RCP 0 patología clínica de rutina, LSB = bioquímica de seguridad hepática, PK = farmacocinética, OA = otro análisis, L = lípidos.	

Se determinaron los siguientes parámetros para todos los animales sobrevivientes en las ocasiones indicadas a continuación:

- panel completo de bioquímica (lista completa a continuación) - en los días -8, 15 y 50,
- Seguridad hepática (solo ASAT, ALP, ALAT, TBIL y GGT): los días 4, 8, 22 y 36,
- perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C y triglicéridos) y solo Apo-B - en los días -1, 4, 8, 22, 29, 36 y 43.

Se tomó sangre (aproximadamente 1,0 ml) en tubos de heparina de litio (mediante el uso del analizador de bioquímica sanguínea ADVIA 1650): Apo-B, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo inorgánico, glucosa, HDL-C, LDL-C, urea, creatinina, bilirrubina total (TBIL), colesterol total, triglicéridos, fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALAT),

aspartato aminotransferasa (ASAT), creatina quinasa, gamma-glutamyl transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa, proteínas totales, albúmina, relación de albúmina/globulina.

5 Análisis de PCSK9 en sangre: Se recolectaron muestras de sangre para el análisis de PCSK9 desde los días -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50. Se recolectó sangre venosa (aproximadamente 2 ml) de una vena apropiada en cada animal en un Tubo de separación de suero (SST) y se dejó coagular durante al menos 60 ± 30 minutos a temperatura ambiente. La sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos en condiciones refrigeradas (configurada para mantener +4 °C). El suero se transferirá a 3 tubos individuales y se almacenará a -80 °C hasta que se analice en CitoxLAB France mediante el uso de un método de ELISA (kit ELISA de PCSK9 Circulex Human, CY-8079, validado para muestras de mono cynomolgus).

15 Otro análisis: El documento WO2011009697 proporciona los métodos para el siguiente análisis: qPCR, análisis de ARNm de PCSK9. Otro análisis incluye ELISA de proteína PCSK9, análisis de Lp(a) en suero con ELISA (Mercodia No. 10-1106-01), análisis de oligonucleótidos de tejido y plasma (contenido de fármaco), extracción de muestras, muestras estándar y de control de calidad, determinación del contenido de oligonucleótidos mediante ELISA.

Los datos para los compuestos de direccionamiento de PCSK9 se muestran en la siguiente tabla:

Valores para dosis de 2,5 mg/kg			Efecto máximo de PCSK9 (los datos representan el porcentaje de predosis)	Efecto máximo de LDL-C (los datos representan el porcentaje de predosis)
SEQ ID del Compuesto	proteína PCSK9 día 4 (porcentaje de predosis)	proteína PCSK9 día 29 (porcentaje de predosis)		
10	86	71,5	69 % (d15)	87 % (d29)
13	81	71	71 % (d29)	84 % (d22)
18	57	42	<u>42 % (d29)</u>	<u>71 % (d15)</u>
21	80,5	56	55 % (d29)	84 % (d15)
20	51	53	48 % (d4)	94 % (D8)
19	55	60	<u>55 % (d4)</u>	<u>89 % (D4)</u>

40 No hubo indicios de hepatotoxicidad o nefrotoxicidad con los compuestos de direccionamiento de PCSK9. En particular, los compuestos PCSK9-GalNAc dieron una regulación negativa rápida y altamente eficaz de PCSK9 que se mantuvo durante un período de tiempo extenso (duración completa del estudio), lo que ilustra que los compuestos conjugados de GalNAc son más eficaces, ambos en términos de una inactivación inicial y de larga duración, lo que indica que pueden dosificarse de manera relativamente infrecuente y a una dosis más baja, en comparación con los compuestos progenitores no conjugados y los compuestos que usan la tecnología de conjugación alternativa, tal como la conjugación de colesterol. La SEQ ID NO 18 proporcionó una regulación negativa rápida y constante de PCSK9 y LDL-C a lo largo de la duración del estudio (visto en el día 34 a una dosis de 2,5 mg/kg, con una notable regulación negativa de PCSK9 observada 48 días después de la administración de la dosis única de 2,5 mg/kg donde el nivel de proteína PCSK9 en plasma fue del 71 % de la predosis).

50 Ejemplo 5: Evaluación de toxicidad hepática y renal en ratas.

Los compuestos de la invención pueden evaluarse para determinar su perfil de toxicidad en roedores, tal como en ratones o ratas. Puede usarse el siguiente protocolo: Wistar Han CrI: WI (Han) se usaron a una edad de aproximadamente 8 semanas. A esta edad, los machos pesaban aproximadamente 250 g. Todos los animales tenían libre acceso a la dieta de mantenimiento granulada SSNIFF R/M-H (SSNIFF Spezialdiäten GmbH, Soest, Alemania) y al agua del grifo (filtrada con un filtro de 0,22 µm) contenida en botellas. Se usó el nivel de dosis de 10 y 40 mg/kg/dosis (administración subcutánea) y se dosificó los días 1 y 8. Los animales se sacrificaron en el día 15. Se recolectaron muestras de orina y sangre los días 7 y 14. Se realizó una evaluación de patología clínica el día 14. El peso corporal se determina antes del estudio, el primer día de administración y 1 semana antes de la necropsia. El consumo de alimentos por grupo se evaluó diariamente. Se tomaron muestras de sangre a través de la vena de la cola después de 6 horas de ayuno. Se realizó el siguiente análisis de suero sanguíneo: recuento de eritrocitos, volumen celular medio, volumen celular empaquetado, hemoglobina, concentración media de hemoglobina celular, recuento de trombocitos, recuento de leucocitos, recuento diferencial de glóbulos blancos con morfología celular, recuento de reticulocitos, sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo inorgánico, glucosa, urea, creatinina, bilirrubina total, colesterol total, triglicéridos, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, proteína total, albúmina, relación albúmina/globulina. Se realizó un análisis de orina: α-GST, β-2 Microglobulina, Calbindina, Clusterina, Cistatina C, KIM-1, Osteopontina, TIMP-1, VEGF y NGAL. Se cuantificaron

siete analitos (Calbindina, Clusterina, GST- $\alpha$ , KIM-1, Osteopontin, TIMP-1, VEGF) en el Panel 1 (MILLIPLEX® MAP Ratney Toxicity Magnetic Bead Panel 1, RKTX1MAG-37K). Se cuantificaron tres analitos (Microglobulina  $\beta$ -2, Cistatina C, Lipocalina-2/NGAL) en el Panel 2 (Panel 2 de perlas magnéticas de toxicidad renal en rata MILLIPLEX® MAP, RKTX2MAG-37K). El ensayo para la determinación de la concentración de estos biomarcadores en orina de rata se basó en la tecnología Luminex xMAP®. Las microesferas recubiertas con anti-  $\alpha$ -GST / microglobulina  $\beta$ -2 / calbindina / clusterina / cistacina C / KIM-1 / osteopontina / TIMP-1 / VEGF / NGAL se codificaron por color con dos colorantes fluorescentes diferentes. Se determinaron los siguientes parámetros (orina mediante el uso del ADVIA 1650): Proteína de orina, creatinina de orina. Parámetros cuantitativos: volumen, pH (mediante el uso de tiras de prueba 10-Multistix SG/analizador de orina Clinitek 500), gravedad específica (mediante el uso de un refractómetro). Parámetros semicuantitativos (mediante el uso de tiras de prueba 10-Multistix SG/analizador de orina Clinitek 500): proteínas, glucosa, cetonas, bilirrubina, nitritos, sangre, urobilinógeno, citología de sedimento (mediante examen microscópico). Parámetros cualitativos: Apariencia, color. Después del sacrificio, se determinan el peso corporal y el peso del riñón, el hígado y el bazo y se calcula la relación de órganos con respecto a peso corporal. Se tomaron muestras de riñón e hígado y se congelaron o almacenaron en formalina. Se realizó un análisis microscópico. Los datos para la expresión de Kim-1 se muestran en la Figura 15, donde se demuestra que todas las moléculas, excepto la SEQ ID NO 4, tenían una señal urinaria de kim-1 más baja que la SEQ ID NO 1, lo que demuestra una seguridad renal mejorada frente a la molécula no conjugada original y previamente caracterizada.

Ejemplo 6 Análisis de enlazadores escindibles

Los oligómeros antisentido marcados con FAM (ASO) con diferentes enlazadores de ADN/PO se sometieron a escisión *in vitro* en extracto de nucleasa S1 (tabla a continuación), homogenizados de hígado o riñón o suero.

#	Sec (5'-3')	Enlazador escindible (B)	Conjugado (C)
35	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'tca3')	FAM
36	GCattggtatTCA	2PO-ADN (5'ca3')	FAM
37	GCattggtatTCA	1PO-ADN (5'a3')	FAM
38	GCattggtatTCA	3PO-ADN (5'gac3')	FAM
39	GCattggtatTCA	no	FAM

Las letras mayúsculas son nucleósidos de LNA (tal como beta-D-oxi LNA), las letras minúsculas son nucleósidos de ADN. El subíndice s representa un enlace fosforotioato internucleósidos. Las citosinas de LNA son opcionalmente 5-metil citosina. La porción de conjugado FAM se muestra en la figura 6 y las moléculas se muestran en la figura 7.

Los ASO marcados con FAM 100  $\mu$ M con diferentes enlazadores de ADN/PO se sometieron a escisión *in vitro* por nucleasa S1 en tampón de nucleasa (60 U por 100  $\mu$ L) durante 20 y 120 minutos (A). La actividad enzimática se detuvo añadiendo EDTA a la solución tampón. Después, las soluciones se sometieron a análisis de AIE HPLC en un Dionex Ultimate 3000 mediante el uso de una columna Dionex ADNpac p-100 y un gradiente que varía de 10 mM - 1 M de perclorato de sodio a pH 7,5. El contenido de oligonucleótidos escindidos y no escindidos se determinó frente a un estándar mediante el uso tanto de un detector de fluorescencia a 615 nm como de un detector uv a 260 nm.

SEQ ID NO	Secuencia de enlazador	% escindido después de 20 min de S1	% escindido después de 120 min de S1
39	--	2	5
37	a	29,1	100
36	ca	40,8	100
35	tca	74,2	100
38	gac	22,9	n.d.

Conclusión: Los enlazadores de PO (o la región B como se denomina en la presente descripción) dan como resultado la escisión del conjugado (o grupo C), y tanto la longitud y/o la composición de secuencia del enlazador pueden usarse para modular la susceptibilidad a la escisión nucleolítica de la región B. La secuencia de los enlazadores de ADN/PO puede modular la tasa de escisión como se observa después de 20 minutos en el extracto de Nucleasa S1. La selección de secuencia para la región B (por ejemplo, para el enlazador de ADN/PO) también puede usarse para modular el nivel de escisión en suero y en células de tejidos diana.

Los homogeneizados de hígado y riñón y el suero se añadieron con el compuesto SEQ ID NO 35 a concentraciones de 200  $\mu$ g/g de tejido. Las muestras de hígado y riñón recolectadas de ratones NMRI se homogeneizaron en un tampón de homogeneización (0,5 % de Igepal CA-630, Tris 25 mM pH 8,0, NaCl 100 mM, pH 8,0 (ajustado con NaOH 1 N)). Los homogeneizados se incubaron durante 24 horas a 37 °C y después se extrajeron los homogeneizados con fenol -

cloroformo. El contenido de oligo escindido y no escindido en el extracto de hígado y riñón y del suero se determinó frente a un estándar mediante el uso del método de HPLC anterior:

Seq ID	Secuencia de enlazador	% escindido después de 24 horas de homogeneizado de hígado	% escindido después de 24 horas de homogeneizado de riñón	% escindido después de 24 horas en suero
35	tca	83	95	0

5

10 Conclusión: Los enlazadores de PO (o la región B a la que se denomina en la presente descripción) dan como resultado que el conjugado (o grupo C) se escinda, en homogeneizado de hígado o riñón, pero no en suero. La susceptibilidad a la escisión en los ensayos que se muestran en el Ejemplo 6 puede usarse para determinar si un enlazador es bioescindible o fisiológicamente lábil. Nótese que la escisión en los ensayos anteriores se refiere a la escisión del enlazador escindible, el oligómero o la región A deben permanecer funcionalmente intactos.

15

Ejemplo 7: Inactivación de ARNm de PCSK9 con conjugados de colesterol *in vivo*

PCSK9 - Compuestos específicos para ratones

#	Seq (5'-3') (A)	Enlazador escindible (B)	Conjugado (C)
40	GTctgtggaaGCG	no	no
41	GTctgtggaaGCG	no	Colesterol
42	GTctgtggaaGCG	2PO-ADN (5'ca3')	Colesterol
43	GTctgtggaaGCG	2PO-ADN (5'ct3')	Colesterol

20

25

30 A los ratones NMRI se les inyectó una dosis única de solución salina o 10 mg/kg de oligonucleótido antisentido de LNA no conjugado (SEQ ID 40) o cantidades equimolares de oligonucleótidos antisentido de LNA conjugados con colesterol con diferentes enlazadores y se sacrificaron los días 1-10 de acuerdo con la Tab. 5.

30

35 El ARN se aisló del hígado y el riñón y se sometió a qPCR con cebadores específicos de PCSK9 y una sonda para analizar la inactivación del ARNm de PCSK9. Los resultados se muestran en la figura 14.

35

40 Conclusiones: El colesterol conjugado con un oligonucleótido antisentido LNA de PCSK9 con un enlazador compuesto por 2 ADN con cadena principal fosfodiéster (SEQ ID NO 42 y SEQ ID NO 43) mostró una mejor inactivación en hígado de PCSK9 (Figura 14) en comparación con el compuesto no conjugado (SEQ ID NO 40), así como en comparación con los conjugados de colesterol con enlazador estable (SEQ ID NO 41).

40

Materiales y métodos:

45

50

55

60

65

*Diseño experimental:*

Parte	Grupo núm.	Número de identificación del animal	Núm. de animales	Cepa animal/género/alimento	Nivel de dosis del compuesto por día	Conc. al volumen de dosis 10 ml/kg	Ruta de adm.	Día de dosificación	Día de peso corporal	Día de sacrificio
A	1	1-3	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	iv	0	0,1	1
	2	4-6	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10 mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0,1	1
	3	7-9	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 equimolar 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0,1	1
	5	13-15	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,1	1
	6	16-18	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,1	1
B	7	19-21	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	iv	0	0,3	3
	8	22-24	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10 mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0,3	3
	9	25-27	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 equimolar 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0,3	3
	11	31-33	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,3	3
	12	34-36	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,3	3
C	13	37-39	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	iv	0	0,7	7
	14	40-42	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10 mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0,7	7
	15	43-45	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 equimolar 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0,7	7

(continuación)

Parte	Grupo número	Número de identificación del animal	Núm. de animales	Cepa animal/género/alimento	Nivel de dosis del compuesto por día	Conc. al volumen de dosis 10 ml/kg	Ruta de adm.	Día de dosificación	Día de peso corporal	Día de sacrificio
	17	49-51	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,7	7
	18	52-54	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 43 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,7	7
	19	55-57	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	iv	0	0,7, 10	10
	20	58-60	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 40 10 mg/kg	1 mg/ml	iv	0	0,7, 10	10
D	21	61-63	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 41 equimolar 11,3mg/kg	1,13 mg/ml	iv	0	0,7,10	10
	24	70-72	3	NMRI/♀/Chow	SEQ ID NO 42 equimolar 12,7mg/kg	1,27 mg/ml	iv	0	0,7, 10	10
A	25	73-75	3	NMRI/♀/Chow	Solución salina	-	iv	0	0,1	1

## ES 2 770 667 T3

Dosis de administración. Se les administró una dosis a animales hembras NMRI, de aproximadamente 20 g a la llegada, con 10 ml por kg de peso corporal (de acuerdo con el día 0 de peso corporal) iv del compuesto formulado en solución salina o solución salina sola de acuerdo con la tabla anterior.

5 *Toma de muestra de tejido hepático y renal.* Los animales fueron anestesiaron con 70 % de CO<sub>2</sub>-30 % de O<sub>2</sub> y se sacrificaron por dislocación cervical de acuerdo con la Tabla 4. La mitad del lóbulo hepático grande y un riñón fueron picados y sumergidos en RNAlater.

10 El ARN total se extrajo de un máximo de 10 mg de tejido homogeneizado mediante molienda con perlas en presencia de tampón de tejido de aislamiento de ARN MagNA Pure LC (Roche núm. de catálogo 03 604 721 001) mediante el uso del kit de gran volumen de ARN celular MagNa Pure 96 (Roche núm. de catálogo 5467535001), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis de la primera cadena se realizó mediante el uso de reactivos de transcriptasa inversa de Ambion de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

15 Para cada muestra, se ajustaron 0,5 µg de ARN total (10,8 µl) con H<sub>2</sub>O libre de ARNasa y se mezclaron con 2 µl de decámeros aleatorios (50 µM) y 4 µl de mezcla de dNTP (2,5 mM de cada dNTP) y se calentaron a 70 °C durante 3 minutos después de lo cual las muestras se enfrían rápidamente en hielo. Se añadieron 2 µl de Tampón RT 10x, 1 µl de transcriptasa inversa de MMLV (100 U/µl) y 0,25 µl de inhibidor de RNasa (10 U/µl) a cada muestra, seguido de incubación a 42 °C durante 60 min, inactivación por calor de la enzima a 95 °C durante 10 min y después la muestra se enfrió a 4 °C.

20 Las muestras de ADNc se diluyeron 1: 5 y se sometieron a RT-QPCR mediante el uso de Taqman Fast Universal PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems Cat # 4364103) y ensayo de expresión génica Taqman (mPCSK9, Mn00463738\_m1 y mActin # 4352341E) siguiendo el protocolo del fabricante y se procesaron en un instrumento de RT-qPCR de Applied Biosystems (7500/7900 o ViiA7) en modo rápido.

25 Ejemplo 8: Estudio en primates no humanos; inyecciones múltiples s.c.

El objetivo de este estudio en primates no humanos fue evaluar la eficacia y la seguridad de los compuestos anti-PCSK9 en un contexto de administración repetida, cuando los compuestos se administraron mediante inyección subcutánea (s.c.). Los compuestos usados en este estudio fueron las SEQ ID NO 2, 3, 18 y 19, preparadas en solución salina estéril (0,9 %) a una concentración inicial de 0,625 y 2,5 mg/ml.

Se usaron monos cynomolgus hembras de al menos 24 meses de edad, y se les dio acceso libre al agua del grifo y se distribuyeron diariamente 180 g de dieta expandida OWM(E) SQC SHORT (Dietex France, SDS, Saint Gratien, France) por animal. Además, se le dio fruta o verdura diariamente a cada animal. Los animales se aclimataron a las condiciones del estudio durante un período de al menos 14 días antes del comienzo del período de tratamiento. Durante este período, se realizaron investigaciones previas al tratamiento. A los animales se les administró una dosis s.c. una vez por semana durante cuatro semanas a una dosis de 0,5 mg/kg (SEQ ID NO 2, 3, 18 y 19) o 1,5 mg/kg/inyección (SEQ ID NO 18 y 19), con cuatro inyecciones totales durante un período de cuatro semanas. El volumen de la dosis fue de 0,4 ml/kg/inyección. Se usaron seis animales por grupo. Después de la cuarta y última dosis los animales se observaron durante una semana, después de lo cual se sacrificó la mitad de los animales para estudiar la regulación de la transcripción de apoB hepático, los parámetros lipídicos, la histología hepática y renal, y la distribución en tejido hepático y renal. El día 1 corresponde al primer día del período de tratamiento. Las observaciones clínicas y el peso corporal y la ingesta de alimentos (por grupo) se registraron antes y durante el estudio.

45 Se tomaron muestras de sangre y tejidos y se analizaron en los siguientes puntos de tiempo:

Día del estudio	Parámetros
-10	L, Apo-B, OA
50 -5	LSB, L, Apo-B, OA
-1	RCP, L, Apo-B, PK, OA
1	Dosificación
55 8 predosis	LSB, L, Apo-B, PK, OA
8	Dosificación
15 predosis	LSB, L, Apo-B, PK, OA
60 15	Dosificación
22 predosis	LSB, L, Apo-B, PK, OA
22	Dosificación
65 29	RCP, PK, OA + necropsia principal

36 (animales de recuperación)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
43 (animales de recuperación)	RCP, PK, Apo-B, PK, OA
50 (animales de recuperación)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
57 (animales de recuperación)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
64 (animales de recuperación)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
71 (animales de recuperación)	LSB, L, Apo-B, PK, OA
78 (animales de recuperación)	RCP, L, Apo-B, PK, OA + recuperación de necropsia
RCP: patología clínica de rutina, LSB: bioquímica de seguridad hepática, PK: farmacocinética, OA: otros análisis, L: lípidos	

Se tomó sangre (aproximadamente 1,0 ml) en tubos de heparina de litio (mediante el uso del analizador de bioquímica sanguínea ADVIA 1650) analizando sodio, potasio, cloruro, calcio, fósforo inorgánico, glucosa, HDL-C, LDL-C, urea, creatinina, bilirrubina total (TBIL), colesterol total, triglicéridos, fosfatasa alcalina (ALP), alanina aminotransferasa (ALAT), aspartato aminotransferasa (ASAT), creatina quinasa, gamma-glutamil transferasa (GGT), lactato deshidrogenasa, proteína total, albúmina, relación de albúmina/globulina.

Análisis de sangre: Las muestras de sangre para el análisis de ApoB se recolectaron solo de animales del Grupo 1-16 (es decir, animales tratados con compuestos anti-ApoB) en los días -8, -1, 4, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50. Se recolectó sangre venosa (aproximadamente 2 ml) de una vena apropiada en cada animal en un tubo de separación de suero (SST) y se dejó coagular durante al menos 60 ± 30 minutos a temperatura ambiente. La sangre se centrifugó a 1 000 g durante 10 minutos en condiciones refrigeradas (configurada para mantener +4 °C). El suero se transfirió a 3 tubos individuales y se almacenó a -80 °C hasta el análisis de la proteína ApoB mediante ELISA.

Otro análisis: El documento WO2010142805 proporciona los métodos para el siguiente análisis: qPCR, análisis de ARNm de ApoB. Otros análisis incluyen, análisis de Lp(a) en suero con ELISA (Mercodia núm, 10-1106-01), análisis de oligonucleótidos en tejido y suero (contenido de fármaco), extracción de muestras, muestras estándar y de control de calidad, determinación del contenido de oligonucleótidos mediante ELISA.

La farmacología prevista para un oligonucleótido anti-PCSK9 es la reducción del colesterol asociado a LDL mediante una reducción de la proteína PCSK9 en circulación ("PCSK9 en suero"). Las moléculas conjugadas con GalNAc demostraron una eficacia mejorada en comparación con las moléculas no conjugadas cuando se estudiaron tanto PCSK9 como el colesterol asociado a LDL en suero (Figura 16 y Figura 17). La Figura 16 ilustra que cuatro inyecciones semanales de 0,5 mg/kg/inyección de la SEQ ID NO 2 no conjugada tuvieron solo efectos menores sobre el PCSK9 y el colesterol asociado a LDL en suero, mientras que el conjugado de GalNAc del mismo gámpero de LNA (SEQ ID 18) tuvo un potente efecto reductor tanto en PCSK9 como en el colesterol asociado a LDL en suero. Se observó la misma relación al comparar los datos para las inyecciones múltiples de SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 19 (Figura 17): solo efectos menores de la molécula no conjugada y la potente regulación negativa de PCSK9 y colesterol asociado a LDL en suero por el conjugado de GalNAc correspondiente (SEQ ID NO 19). Nótese que los efectos de las SEQ ID 18 y 19 sobre PCSK9 y colesterol asociado a LDL e suero fueron dependientes de la dosis y con una larga duración de acción, con PCSK9 y colesterol asociado a LDL en suero más bajos que los niveles de referencia promedio durante al menos siete semanas después de la última inyección (última inyección día 22, datos ilustrados para el período de recuperación hasta el día 71).

El contenido de oligonucleótidos hepáticos y renales se analizó una semana después de la última inyección, es decir, el día 29 del estudio. El contenido de oligonucleótidos se analizó mediante el uso de ELISA de hibridación (esencialmente como se describe en Lindholm y otros, Mol Ther. Febrero de 2012; 20(2):376-81), mediante el uso de la SEQ ID NO 2 para preparar una curva estándar para muestras de animales tratados con la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 18, después de haber controlado que no hubo cambios en el resultado si se usó la SEQ ID NO 18 (conjugada) para la preparación de la curva estándar. De la misma manera, la SEQ ID NO 3 se usó para la preparación de la curva estándar para la SEQ ID NO 3 y SEQ ID NO 19 después de controlar que no hubo diferencia en el resultado si se usó la SEQ ID NO 19 para la preparación de la curva estándar para el análisis de ELISA de esas muestras.

Contenido de oligonucleótidos en los tejidos una semana después de la última inyección.					
	Hígado (µg de oligonucleótido/g de tejido húmedo)		Riñón (µg de oligonucleótido/g de tejido húmedo)		Relación de hígado/riñón
	Promedio	SD	Promedio	SD	
SEQ ID NO 2, 4x0,5 mg/kg	0,260	0,14	30,3	4,8	0,008

5	SEQ ID NO 18, 4x0,5 mg/kg	3,57	0,61	11,5	2,5	0,310
	SEQ ID NO 18, 4x1,5 mg/kg	18,8	1,7	26,8	6,6	0,701
	SEQ ID NO 3, 4x0,5 mg/kg	0,149	0,059	38,2	0,72	0,004
10	SEQ ID NO 19, 4x0,5 mg/kg	2,72	0,69	16,3	1,5	0,167
15	SEQ ID NO 19, 4x1,5 mg/kg	12,2	3,44	41,2	6,5	0,296

Como se ilustra en la tabla anterior, la conjugación de la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 3 dio como resultado mayores de relaciones de hígado/riñón para las moléculas conjugadas (SEQ ID NO 18 y SEQ ID NO 19) que para las moléculas no conjugadas correspondientes una semana después de la última inyección cuando a los animales se les inyectó s.c. una vez/semana durante cuatro semanas. Dado que se han demostrado signos de tubulotoxicidad con otras moléculas anti-PCSK9 no conjugadas (tal como la SEQ ID NO 1, como se ilustra en la Figura 15), y dado que el hígado es el órgano diana para el tratamiento anti-PCSK9, se espera que un cambio a una mayor relación de hígado/riñón de como resultado una mayor seguridad con la SEQ ID NO 18 y 19 conjugada en comparación con la SEQ ID NO 2 y 3 no conjugada.

Como se ilustra en la Figura 16 y la Figura 18, las SEQ ID NO 18 y 19 se dosificaron a niveles farmacológicos relevantes. Los perfiles de química clínica de los mismos animales durante el período de tratamiento y la fase de recuperación no demostraron aumentos clínicamente relevantes en los parámetros de seguridad hepática o renal.

30 Listado de secuencias

- <110> Santaris Pharma A/S
- <120> Oligómeros antisentido y conjugados que se dirigen a PCSK9
- <130> 1141WO
- <160> 46
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 14
- <212> ADN
- 45 <213> ARTIFICIAL
- <220>
- <223> oligonucleótido de gápmo antisentido de LNA
- 50 <220>
- <221> características\_miscláneas
- <222> (1)..(14)
- <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 55 <220>
- <221> características\_miscláneas
- <222> (1)..(3)
- <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 60 <220>
- <221> características\_miscláneas
- <222> (12)..(14)
- <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 65 <400> 1
- tgctacaaaa ccca 14

<210> 2  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 5  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA  
 <220>  
 10 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
 <220>  
 15 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(3)  
 <223> nucleósidos de LNA  
 <220>  
 20 <221> características\_miscláneas  
 <222> (13)..(16)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
 <400> 2  
 25 aatgctacaa aaccca 16  
 <210> 3  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 30  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA  
 <220>  
 35 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
 <220>  
 40 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(3)  
 <223> nucleósidos de LNA  
 <220>  
 45  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(16)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
 50  
 <400> 3  
 aatgctacaa aaccca 16  
 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 55  
 <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA  
 60  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(15)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
 65  
 <220>

- <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 5 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(15)  
 <223> nucleósidos de LNA
- 10 <400> 4  
 gctgtgtgag cttgg 15
- <210> 5  
 <211> 16
- 15 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL
- <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA
- 20 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 <223> nucleósidos de LNA
- 25 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 30 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(16)  
 <223> nucleósidos de LNA
- 35 <400> 5  
 tgctgtgtga gcttgg 16
- <210> 6  
 <211> 16
- 40 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL
- <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(16)
- 50 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(3)
- 55 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(16)
- 60 <223> nucleósidos de LNA
- <400> 6  
 tgctgtgtga gcttgg 16
- 65 <210> 7  
 <211> 16

<212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 5 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(16)  
 10 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(3)  
 15 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(16)  
 20 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 7  
 tcctggtctg tgtcc 16

25 <210> 8  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 35 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 40 <222> (1)..(3)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 45 <222> (15)..(16)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 8  
 tcctggtctg tgtcc 16

50 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

55 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 60 <222> (1)..(1)  
 <223> Colesterol-C6

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 65 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster

- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(16)  
 5 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(5)  
 10 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(16)  
 15 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 9  
 catgctacaa aaccca 16
- 20 <210> 10  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL
- 25 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> Colesterol-C6
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 35 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 40 <222> (3)..(18)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 45 <222> (3)..(5)  
 <223> nucleósidos de LNA
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 50 <222> (15)..(18)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 10  
 caaatgctac aaaaccca 18
- 55 <210> 11  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL
- 60 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 65 <222> (1)..(1)

<223> Colesterol-C6  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 5 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 10 <222> (3)..(18)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 15 <222> (3)..(5)  
 <223> nucleósidos de LNA  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 20 <222> (16)..(18)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
 <400> 11  
 25 caaatgctac aaaaccca 18  
 <210> 12  
 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 30 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA  
 <220>  
 35 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Colesterol-C6  
 <220>  
 40 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster  
 <220>  
 45 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(17)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
 <220>  
 50 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(4)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
 <220>  
 55 <221> características\_miscláneas  
 <222> (16)..(17)  
 <223> nucleósidos de LNA  
 <400> 12  
 60 cagctgtgtg agcttgg 17  
 <210> 13  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 65 <213> ARTIFICIAL

- <220>  
<223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- 5 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(1)  
<223> Colesterol-C6
- 10 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(2)  
<223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- 15 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (3)..(4)  
<223> nucleósidos de LNA
- 20 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (3)..(18)  
<223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 25 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (16)..(18)  
<223> nucleósidos de LNA
- 30 <400> 13  
catgctgtgt gagcttgg 18
- <210> 14  
<211> 18  
<212> ADN
- 35 <213> ARTIFICIAL
- <220>  
<223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- 40 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(1)  
<223> Colesterol-C6
- 45 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(2)  
<223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- 50 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (3)..(18)  
<223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 55 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (3)..(5)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 60 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (16)..(18)  
<223> nucleósidos de LNA
- 65 <400> 14  
catgctgtgt gagcttgg 18

- <210> 15  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 5 <213> ARTIFICIAL  
 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 10 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Colesterol-C6
- <220>  
 15 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- <220>  
 20 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(18)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 25 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(5)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
 30 <221> características\_miscláneas  
 <222> (16)..(18)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 15  
 35 catcctggtc tgtgtcc 18
- <210> 16  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 40 <213> artificial
- <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 45 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Colesterol-C6
- <220>  
 50 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- <220>  
 55 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(18)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 60 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(5)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
 65 <221> características\_miscláneas  
 <222> (17)..(18)

<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 16  
 catcctgggc tgtgtcc 18

5

<210> 17  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

10

<220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>

15

<221> características\_misceláneas  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Conj2a de GalNAc

<220>

20

<221> características\_misceláneas  
 <222> (1)..(14)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>

25

<221> características\_misceláneas  
 <222> (1)..(3)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>

30

<221> características\_misceláneas  
 <222> (12)..(14)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 17  
 tgctacaaaa ccca 14

35

<210> 18  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

40

<220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>

45

<221> características\_misceláneas  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Conj2a de GalNAc

<220>

50

<221> características\_misceláneas  
 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>

55

<221> características\_misceláneas  
 <222> (1)..(3)  
 <223> nucleósidos de LNA

<220>

60

<221> características\_misceláneas  
 <222> (13)..(16)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 18  
 aatgctacaa aacca 16

65

<210> 19  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 5 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 10 <222> (1)..(1)  
 <223> Conj2a de GalNAc  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 15 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 20 <222> (1)..(3)  
 <223> nucleósidos de LNA  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 25 <222> (14)..(16)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
  
 <400> 19  
 aatgctacaa aaccca 16  
 30  
 <210> 20  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 35 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 40 <222> (1)..(1)  
 <223> Conj2a de GalNAc  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 45 <222> (1)..(15)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 50 <222> (1)..(2)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 55 <222> (14)..(15)  
 <223> nucleósidos de LNA  
  
 <400> 20  
 60 gctgtgtgag cttgg 15  
 <210> 21  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 65 <220>

<223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> Conj2a de GalNAc

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 10 <222> (1)..(2)  
 <223> nucleósidos de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 15 <222> (1).. (16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 20 <222> (14)..(16)  
 <223> nucleósidos de LNA

<400> 21  
 tgctgtgtga gcttgg 16  
 25

<210> 22  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 30

<220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Conj2a de GalNAc

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 40 <222> (1)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 45 <222> (1)..(3)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 50 <222> (14)..(16)  
 <223> nucleósidos de LNA

<400> 22  
 tgctgtgtga gcttgg 16  
 55

<210> 23  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL  
 60

<220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 65

- <222> (1)..(1)  
<223> Conj2a de GalNAc
- <220>  
5 <221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(16)  
<223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
10 <221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(3)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
15 <221> características\_miscláneas  
<222> (14)..(16)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 23  
20 tcctggtctg tgtcc 16
- <210> 24  
<211> 16  
<212> ADN  
25 <213> artificial  
<220>  
<223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
30 <221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(1)  
<223> Conj2a de GalNAc
- <220>  
35 <221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(16)  
<223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
40 <221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(3)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
45 <221> características\_miscláneas  
<222> (15)..(16)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 24  
50 tcctggtctg tgtcc 16
- <210> 25  
<211> 14  
<212> ADN  
55 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> motivo de secuencia de nucleobases
- <400> 25  
60 tgctacaaaa ccca 14
- <210> 26  
<211> 16  
65 <212> ADN  
<213> ARTIFICIAL

<220>  
 <223> motivo de secuencia de nucleobases

5 <400> 26  
 aatgctacaa aaccca 16

<210> 27  
 <211> 15  
 10 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <223> motivo de secuencia de nucleobases

15 <400> 27  
 gctgtgtgag cttgg 15

<210> 28  
 <211> 16  
 20 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <223> motivo de secuencia de nucleobases

25 <400> 28  
 tgctgtgtga gcttg 16

<210> 29  
 <211> 16  
 30 <212> ADN  
 <213> ARTIFICIAL

<220>  
 <223> motivo de secuencia de nucleobases

35 <400> 29  
 tcctgtgtctg tgtcc 16

<210> 30  
 <211> 14  
 40 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 30  
 45 uggguuuugu agca 14

<210> 31  
 <211> 16  
 50 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 31  
 55 uggguuuugu agcauu 16

<210> 32  
 <211> 15  
 60 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens

<400> 32  
 ccaagcucac acagc 15

<210> 33  
 65 <211> 16  
 <212> ARN

<213> Homo sapiens  
 <400> 33  
 ccaagcucac acagca           16  
 5  
 <210> 34  
 <211> 16  
 <212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 10  
 <400> 34  
 ggaacacaga ccagga           16  
 15  
 <210> 35  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(3)  
 25 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(1)  
 30 <223> Conjugado de FAM  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (4)..(16)  
 35 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (4)..(5)  
 40 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (14)..(16)  
 45 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C  
 <400> 35  
 tcagcattgg tattca           16  
 50  
 <210> 36  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 60 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster  
 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(1)  
 65 <223> Conjugado de FAM

- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(15)  
 5 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(4)  
 10 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (13)..(15)  
 15 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 36  
 cagcattggt attca 15
- 20 <210> 37  
 <211> 14  
 <212> ADN  
 <213> artificial
- 25 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 30 <222> (1)..(1)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 35 <222> (1)..(1)  
 <223> Conjugado de FAM
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 40 <222> (2)..(14)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 45 <222> (2)..(3)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 50 <222> (12)..(14)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- <400> 37  
 agcattggtta ttca 14
- 55 <210> 38  
 <211> 16  
 <212> ADN  
 <213> artificial
- 60 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 65 <222> (1)..(3)

<223> enlaces internucleósidos fosfodiéster

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 5 <222> (1)..(1)  
 <223> Conjugado de FAM

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 10 <222> (4)..(16)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 15 <222> (4)..(5)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 20 <222> (14)..(16)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 38  
 gacgcattgg tattca 16

25 <210> 39  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 35 <222> (1)..(13)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 40 <222> (1)..(2)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 45 <222> (1)..(1)  
 <223> Conjugado de FAM

<220>  
 <221> características\_miscláneas  
 50 <222> (11)..(13)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C

<400> 39  
 gcattggat tca 13

55 <210> 40  
 <211> 13  
 <212> ADN  
 <213> artificial

60 <220>  
 <223> oligonucleótido de gápmero antisentido de LNA

65 <220>  
 <221> características\_miscláneas

- <222> (1)..(13)  
<223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 5 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(2)  
<223> nucleósidos de LNA
- 10 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (11)..(13)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 15 <400> 40  
gtctgtgaa gcg 13
- 20 <210> 41  
<211> 13  
<212> ADN  
<213> artificial
- <220>  
<223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- 25 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(1)  
<223> Colesterol-C6
- 30 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(13)  
<223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 35 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(2)  
<223> nucleósidos de LNA
- 40 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (11)..(13)  
<223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 45 <400> 41  
gtctgtgaa gcg 13
- 50 <210> 42  
<211> 15  
<212> ADN  
<213> artificial
- <220>  
<223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- 55 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(1)  
<223> Colesterol-C6
- 60 <220>  
<221> características\_miscláneas  
<222> (1)..(2)  
<223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- 65 <220>

- <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(4)  
 <223> nucleósidos de LNA
- 5 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(15)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 10 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (13)..(15)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 15 <400> 42  
 cagtctgtgg aagcg 15
- <210> 43  
 <211> 15
- 20 <212> ADN  
 <213> artificial
- <220>  
 <223> Conjugado de oligonucleótidos de gápmero antisentido de LNA
- 25 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Colesterol-C6
- 30 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (1)..(2)  
 <223> enlaces internucleósidos fosfodiéster
- 35 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(4)  
 <223> nucleósidos de LNA
- 40 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (3)..(15)  
 <223> enlaces fosforotioato internucleósidos
- 45 <220>  
 <221> características\_miscláneas  
 <222> (13)..(15)  
 <223> Nucleósidos de LNA, LNA C son 5-metil C
- 50 <400> 43  
 ctgtctgtgg aagcg 15
- <210> 44  
 <211> 13
- 55 <212> ADN  
 <213> artificial
- <220>  
 <223> motivo de secuencia de nucleobases
- 60 <400> 44  
 gtctgtgaa gcg 13
- 65 <210> 45  
 <211> 13

ES 2 770 667 T3

<212> ARN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 45  
 5 cgcuuccaca gac 13

<210> 46  
 <211> 3731  
 <212> ADN  
 <213> homo sapiens

10 <400> 46

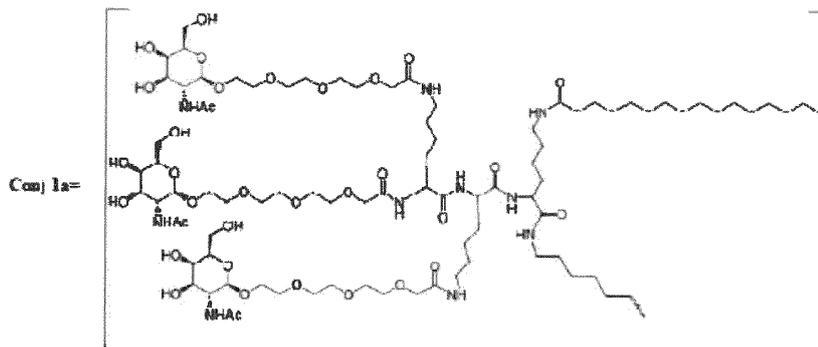
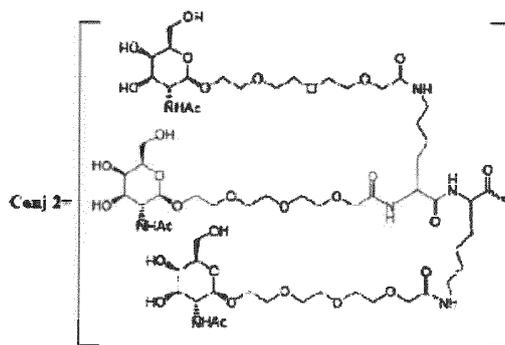
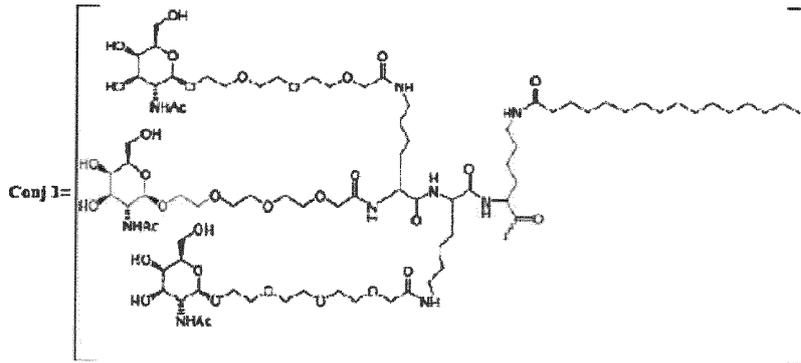
gtccgatggg gctctggtgg cgtgatctgc gcgcccagg cgtcaagcac ccacacccta	60
gaaggtttcc gcagcgacgt cgagggcgctc atggttgacg cggggcgccg ccgttcagtt	120
15 cagggctctga gcctggagga gtgagccagg cagtgagact ggctcgggag ggccgggacg	180
cgctcgttgca gcagcggctc ccagctccca gccaggattc cgcgcgcccc ttcacgcgcc	240
ctgctcctga acttcagctc ctgcacagtc ctccccaccg caaggctcaa ggcgccgccc	300
20 gcgtggaccg cgcacggcct ctaggctctcc tcgccaggac agcaacctct cccttgccc	360
tcatgggcac cgtcagctcc aggcggctct ggtggccgct gccactgctg ctgctgctgc	420
tgctgctcct gggctcccgc ggcgcccgtg cgcaggagga cgaggacggc gactacgagg	480
25 agctgggtgct agccttgctg tccgaggagg acggcctggc cgaagcacc gagcacggaa	540
ccacagccac cttccaccgc tgcgccaagg atccgtggag gttgcctggc acctacgtgg	600
tggtgctgaa ggaggagacc cacctctcgc agtcagagcg cactgcccgc cgctgcagg	660
30 cccaggctgc ccgcccggga tacctcacca agatcctgca tgtcttccat ggcttcttc	720
ctggcttctc ggtgaagatg agtggcgacc tgctggagct ggcttgaag ttgccccatg	780
tcgactacat cgaggaggac tcctctgtct ttgccagag catcccgtgg aacctggagc	840
35 ggattacccc tccacggtac cggggcgatg aataccagcc ccccgacgga ggcagcctgg	900
tggaggtgta tctcctagac accagcatac agagtgacca ccgggaaatc gagggcaggg	960
40 tcatggtcac cgacttcgag aatgtgcccg aggaggacgg gaccgcctc cacagacagg	1020
ccagcaagtg tgacagtcac ggcaccacc tggcaggggt ggtcagcggc cgggatgccg	1080
gcgtggccaa gggtgccagc atgcgcagcc tgcgcgtgct caactgcaa ggaagggca	1140
45 cggttagcgg caccctcata ggctggagt ttattcgaa aagccagctg gtccagcctg	1200
tggggccact ggtggtgctg ctgcccctgg cgggtgggta cagccgcgtc ctcaacgccg	1260
cctgccagcg cctggcgagg gctggggtcg tgctggtcac cgtgcccggc aacttccggg	1320
50 acgatgcctg ccttactcc ccagcctcag ctcccaggt catcacagtt ggggccaaca	1380
atgcccaaga ccagccggtg accctgggga ctttggggac caactttggc cgctgtgtgg	1440
acctctttgc cccaggggag gacatcattg gtgcctccag cgactgcagc acctgctttg	1500
55 tgtcacagag tgggacatca caggctgctg cccacgtggc tggcattgca gccatgatgc	1560
tgtctgccga gccggagctc accctggccg agttgaggca gagactgac cacttctctg	1620
ccaaagatgt catcaatgag gcctggttcc ctgaggacca gcgggtactg accccaacc	1680
60 tggtgccgc cctgcccccc agcaccatg gggcaggtg gcagctgttt tgcaaggactg	1740
tatggtcagc aactcgggg cctacacgga tggccacagc cgtcgcccgc tgcgccccag	1800
atgaggagct gctgagctgc tccagtttct ccaggagtgg gaagcggcgg ggcgagcgca	1860
65 tggaggccca agggggcaag ctggctctgcc gggcccaca cgttttggg ggtgagggtg	1920
tctacgcat tgccaggtgc tgctgctac cccaggccaa ctgcagcgtc cacacagctc	1980

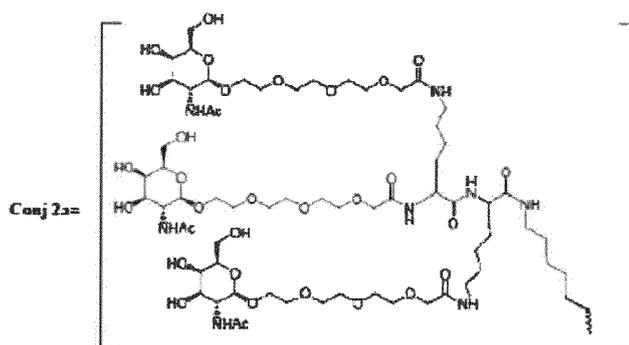
ES 2 770 667 T3

	caccagctga ggccagcatg gggacccgtg tccactgccca ccaacagggc cacgtcctca	2040
	caggctgcag ctcccactgg gaggtggagg accttggcac ccacaagccg cctgtgctga	2100
5	ggccacgagg tcagcccaac cagtgcgtgg gccacagggga ggccagcatc cacgcttcct	2160
	gctgccatgc cccaggtctg gaatgcaaag tcaaggagca tggaatcccg gccctcagg	2220
	agcaggtgac cgtggcctgc gaggagggct ggaccctgac tggctgcagt gccctccctg	2280
10	ggacctccca cgtcctgggg gcctacgccg tagacaacac gtgtgtagtc aggagccggg	2340
	acgtcagcac tacaggcagc accagcgaag gggccgtgac agccgttgcc atctgctgcc	2400
	ggagccggca cctggcgag gcctcccagg agctccagtg acagcccat cccaggatgg	2460
15	gtgtctgggg agggcaagg gctggggctg agctttaaaa tggttccgac ttgtccctct	2520
	ctcagccctc catggcctgg cacgagggga tgggatgct tccgcctttc cggggctgct	2580
20	ggcctggccc ttgagtgggg cagcctcctt gcctggaact cactcactct ggggtgcctcc	2640
	tccccaggtg gaggtgccag gaagctccct ccctcactgt ggggcatttc accattcaaa	2700
	caggtcgagc tgtgctcggg tgctgccagc tgctcccaat gtgccgatgt ccgtgggcag	2760
25	aatgactttt attgagctct tgttccgtgc caggcattca atcctcaggt ctccaccaag	2820
	gaggcaggat tcttcccatg gataggggag ggggcggtag gggctgcagg gacaaacatc	2880
	gttggggggt gagtgtgaaa ggtgctgatg gccctcatct ccagctaact gtggagaagc	2940
30	ccctgggggc tccctgatta atggaggctt agctttctgg atggcatcta gccagaggct	3000
	ggagacaggt gcgcccctgg tggtcacagg ctgtgccttg gtttctgag ccaccttac	3060
35	tctgctctat gccaggctgt gctagcaaca cccaaaggty gcctgcgggg agccatcacc	3120
	taggactgac tcggcagtg gcagtggtgc atgcactgtc tcagccaacc cgctccacta	3180
	cccggcaggg tacacattcg caccctact tcacagagga agaaacctgg aaccagaggg	3240
40	ggcgtgcctg ccaagctcac acagcagaa ctgagccaga aacgcagatt gggctggctc	3300
	tgaagccaag cctcttctta cttcaccgg ctgggctcct catttttacg ggtaacagtg	3360
	aggctgggaa ggggaacaca gaccaggaag ctcggtgagt gatggcagaa cgatgcctgc	3420
45	aggcatggaa ctttttccgt tatcaccag gcctgattca ctggcctggc ggagatgctt	3480
	ctaaggcatg gtcgggggag agggccaaca actgtccctc cttgagcacc agccccacc	3540
	aagcaagcag acatztatct tttgggtctg tcctctctgt tgcttttta cagccaactt	3600
50	ttctagacct gttttgcttt tgtaacttga agatatttat tctgggtttt gtagatttt	3660
	tattaatatg gtgacttttt aaaataaaaa caaacaacg ttgtcctaac aaaaaaaaaa	3720
55	aaaaaaaaa a	3731
60		
65		

REIVINDICACIONES

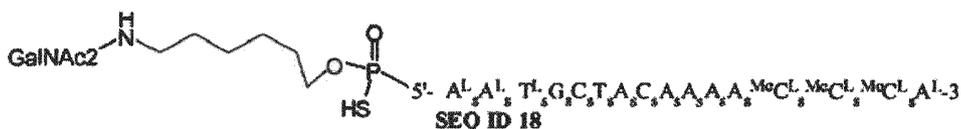
1. Un conjugado de oligonucleótido antisentido que comprende
  - a. un oligómero antisentido (A) de entre 16 - 22 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31, y en donde dicho oligómero antisentido es un gápmero de LNA, y
  - b. al menos una porción de conjugado (C) que se dirige al receptor de asialoglicoproteína unido covalentemente a dicho oligómero (A).
2. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia del oligómero antisentido (A) comprende la secuencia contigua SEQ ID NO 26.
3. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia del oligómero antisentido comprende una secuencia contigua seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO 2 y la SEQ ID NO 3.
4. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la porción de conjugado (C) comprende una porción de N-acetilgalactosamina (GalNAc), tal como una porción de GalNAc monovalente, divalente, trivalente o tetravalente.
5. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la porción de conjugado (C) comprende una porción de GalNAc trivalente.
6. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde la porción de GalNAc trivalente se selecciona del grupo que consiste en Conj 1, 2, 1a y 2a:



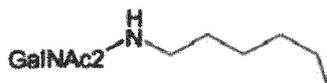


5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

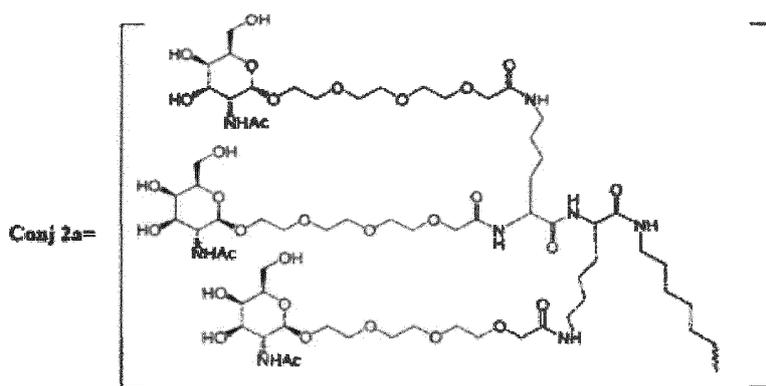
7. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en la SEQ ID NO 18 y la SEQ ID NO 19.
8. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el oligómero antisentido (A) se conjuga con la porción de conjugado (C) a través de una región enlazadora (B y/o Y) situada entre la secuencia contigua del oligómero y la porción de conjugado.
9. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el enlazador se selecciona de un grupo aminoalquilo C6 a C12 o un enlazador fosfato de nucleótidos bioescindible que comprende entre 1 y 6 nucleótidos.
10. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la secuencia contigua comprende análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad.
11. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dichos análogos nucleotídicos son nucleótidos modificados con azúcar seleccionados independientemente o dependientemente del grupo que consiste en unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, y unidades de 2'-fluoro-ADN.
12. El oligonucleótido antisentido de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el oligómero comprende uno o más enlaces nucleosídicos seleccionados del grupo que consiste en fosfortioato, fosforoditioato y boranofosfato.
13. El conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el conjugado de oligonucleótidos consiste en la SEQ ID NO 18 o la SEQ ID NO 19



en donde  
 un superíndice <sup>L</sup> identifica una unidad de beta-D-oxi LNA,  
 un <sup>Me</sup>C identifica una 5-metilcitosina,  
 un subíndice <sub>s</sub> identifica un enlace fosfortioato internucleósidos, y en donde



es un receptor conjugado de asialoglicoproteína Conj 2a que se dirige a una porción de conjugado



14. Un oligómero de entre 16 - 20 nucleótidos de longitud, que comprende una secuencia contigua de 16 nucleótidos que son complementarios a una longitud correspondiente de la SEQ ID NO 31, en donde dicho oligómero es un gámpmero de LNA.
15. El oligómero de la reivindicación 14, en donde la secuencia contigua comprende análogos nucleotídicos mejoradores de la afinidad seleccionados de independientemente o dependientemente del grupo que consiste en unidades de 2'-O-alkil-ARN, unidades de 2'-OMe-ARN, unidades de 2'-amino-ADN, y unidades de 2'-fluoro-ADN.
16. El oligómero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 15, en donde el oligómero comprende uno o más enlaces nucleosídicos seleccionados del grupo que consiste en fosfortioato, fosforditioato y boranofosfato.
17. El oligómero de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que comprende una secuencia contigua de la SEQ ID NO 2 o la SEQ ID NO 3.
18. Una composición farmacéutica que comprende el oligómero o conjugado de oligonucleótidos antisentido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 y un diluyente, portador, sal o adyuvante farmacéuticamente aceptable.
19. El oligómero o el conjugado de oligonucleótidos antisentido o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, para su uso como un medicamento.
20. El oligómero o el oligonucleótido antisentido o la composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para su uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia o el trastorno relacionado, tal como un trastorno seleccionado del grupo que consiste en aterosclerosis, hiperlipidemia, hipercolesterolemia, hipercolesterolemia familiar, *por ejemplo*, con mutaciones de ganancia de función en PCSK9, desequilibrio de colesterol asociado a HDL/LDL, dislipidemias, *por ejemplo*, hiperlipidemia familiar (FCHL) o hipercolesterolemia familiar (FHC), hiperlipidemia adquirida, hipercolesterolemia resistente a las estatinas, enfermedad arterial coronaria (CAD) y enfermedad cardíaca coronaria (CHD).
21. Un método *in vitro* para la inhibición de PCSK9 en una célula que expresa PCSK9, dicho método comprende administrar un oligómero o conjugado de oligonucleótidos antisentido o composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 a dicha célula.
- 35
- 40
- 45

Figura 1

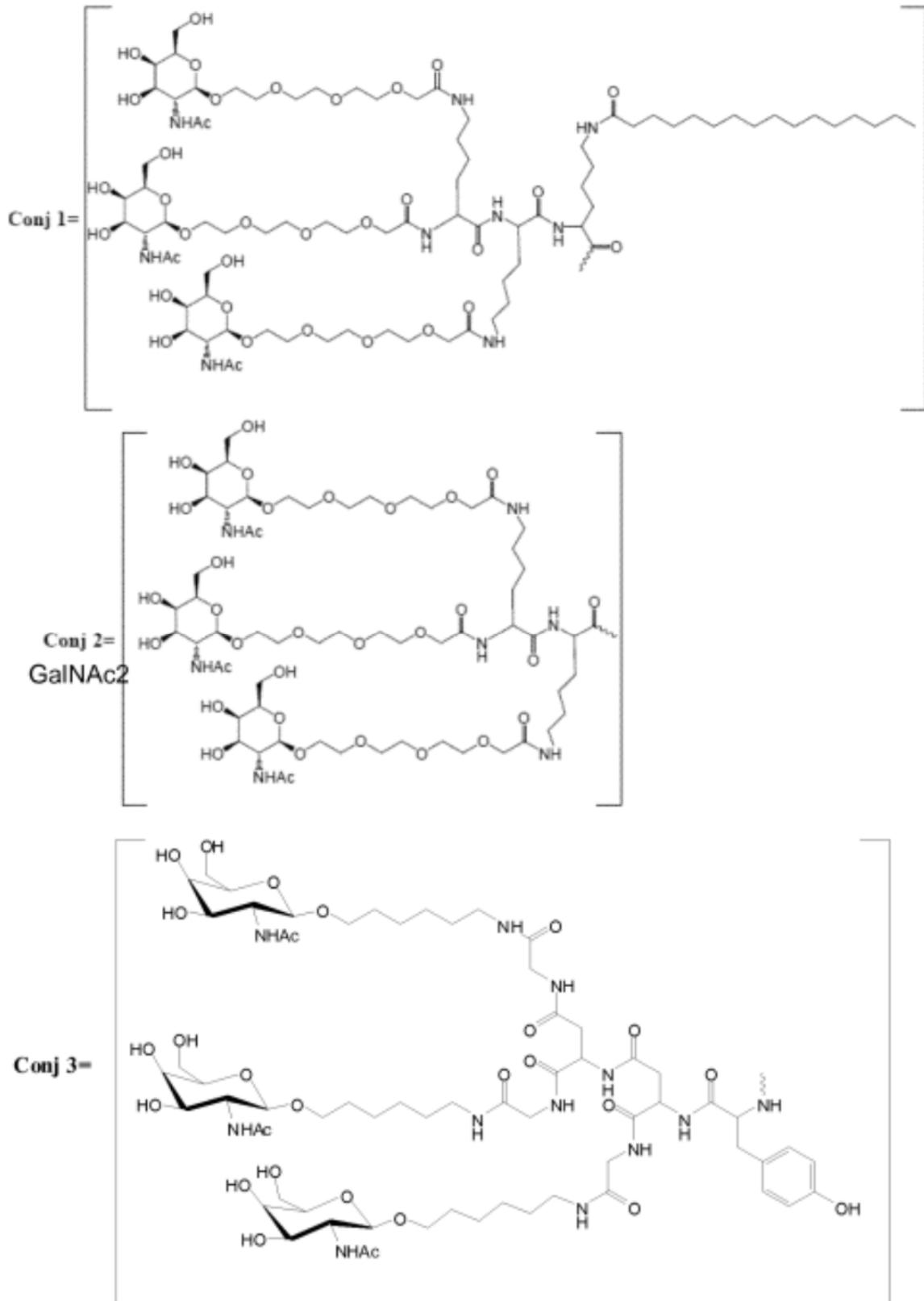


Figura 1 (cont)

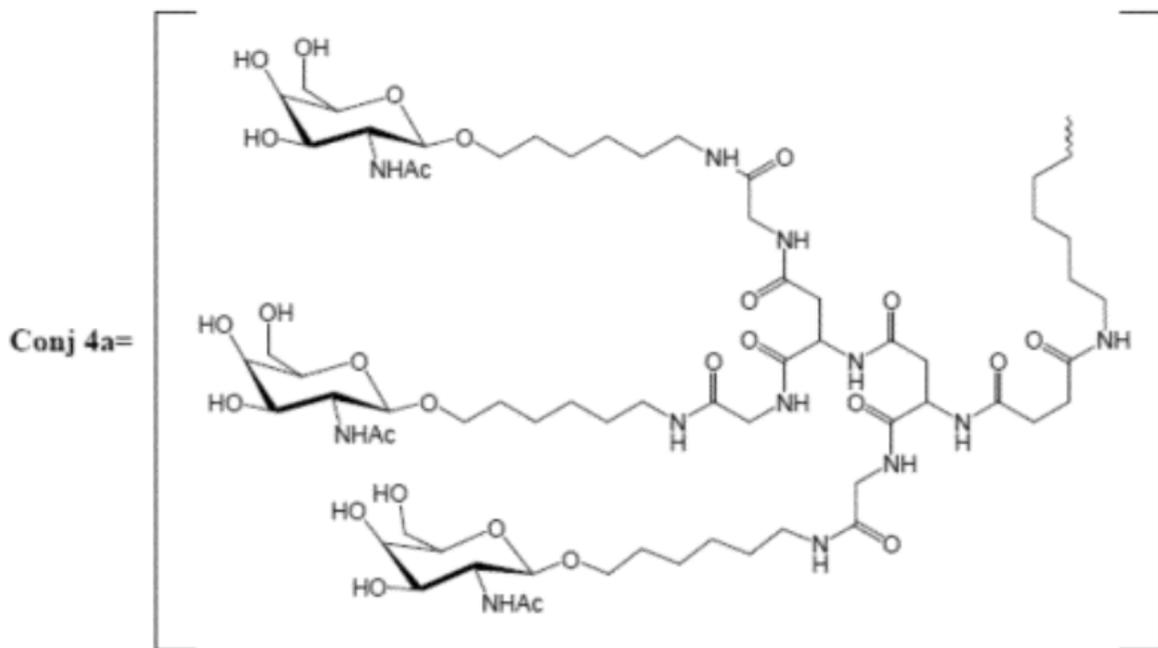
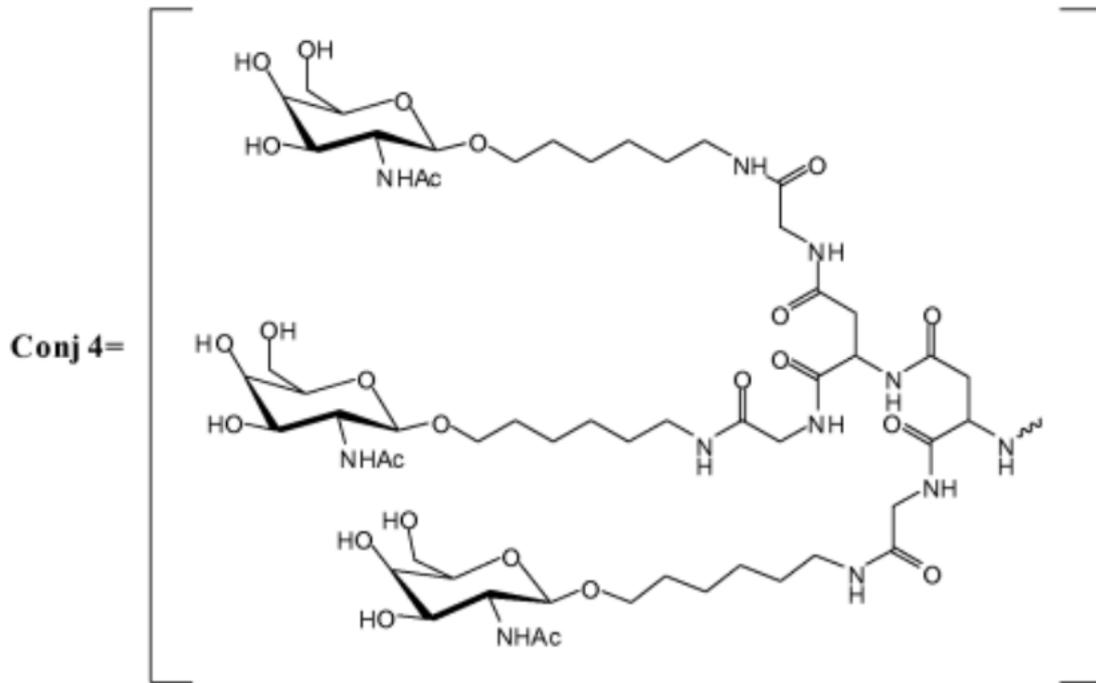


Figura 1 (cont)

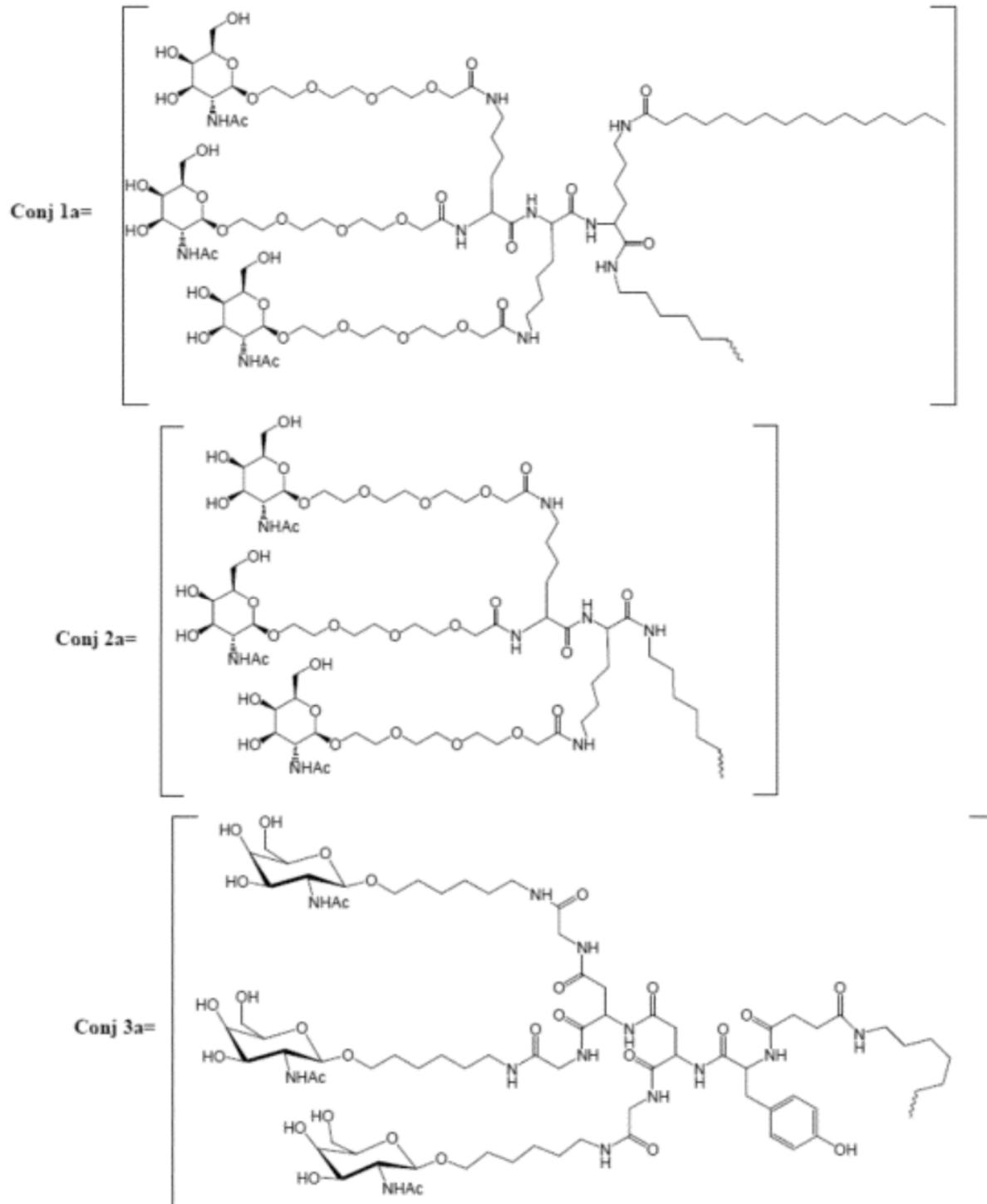


Figura 2

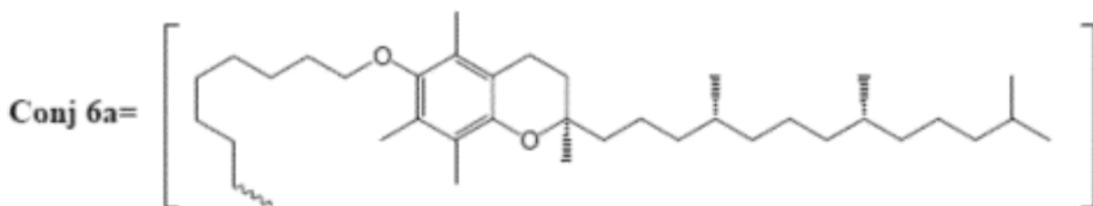
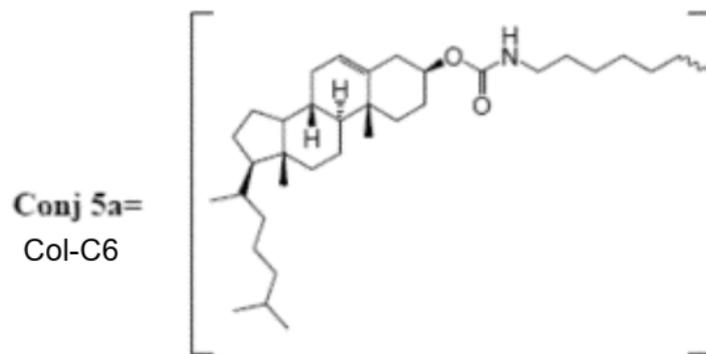
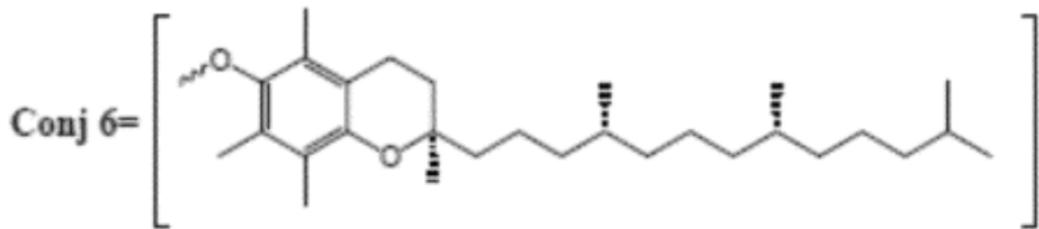
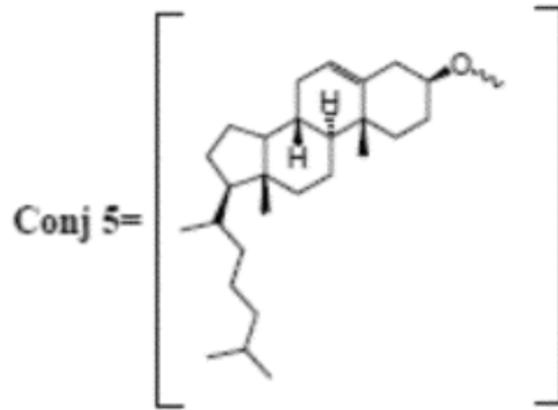


Figura 3

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub><sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
**SEQ ID 1**

5'-A<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub><sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
**SEQ ID 2**

5'-A<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>A<sub>s</sub>C<sub>s</sub><sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>A<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
**SEQ ID 3**

5'-G<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>A<sub>s</sub>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
**SEQ ID 4**

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>A<sub>s</sub>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
**SEQ ID 5**

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>A<sub>s</sub>G<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>G<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
**SEQ ID 6**

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'  
**SEQ ID 7**

5'-T<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>C<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>G<sub>s</sub>T<sub>s</sub>T<sub>s</sub><sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>MeC<sub>s</sub><sup>L</sup>-3'</sup>  
**SEQ ID 8**

Figura 4

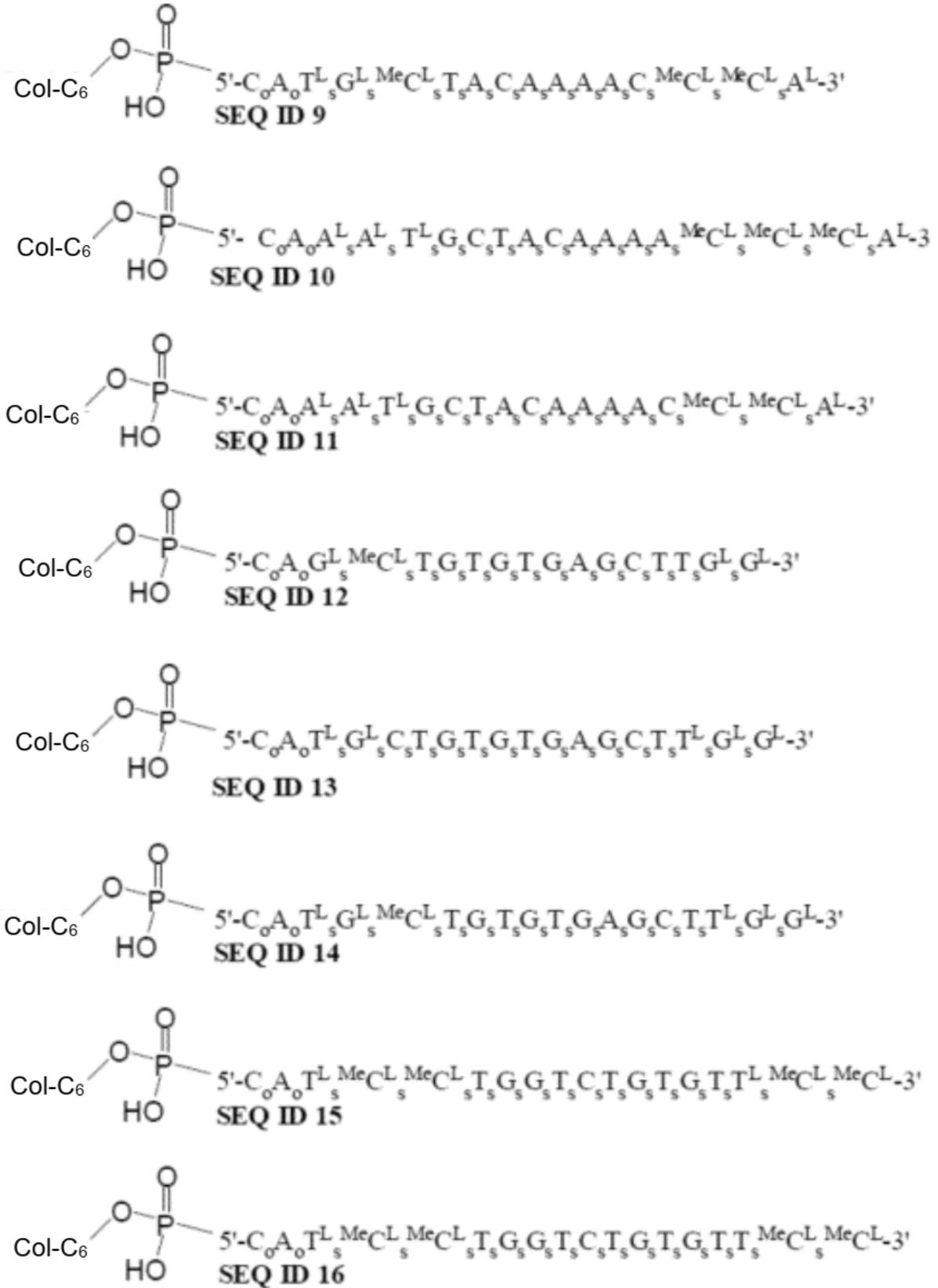


Figura 5

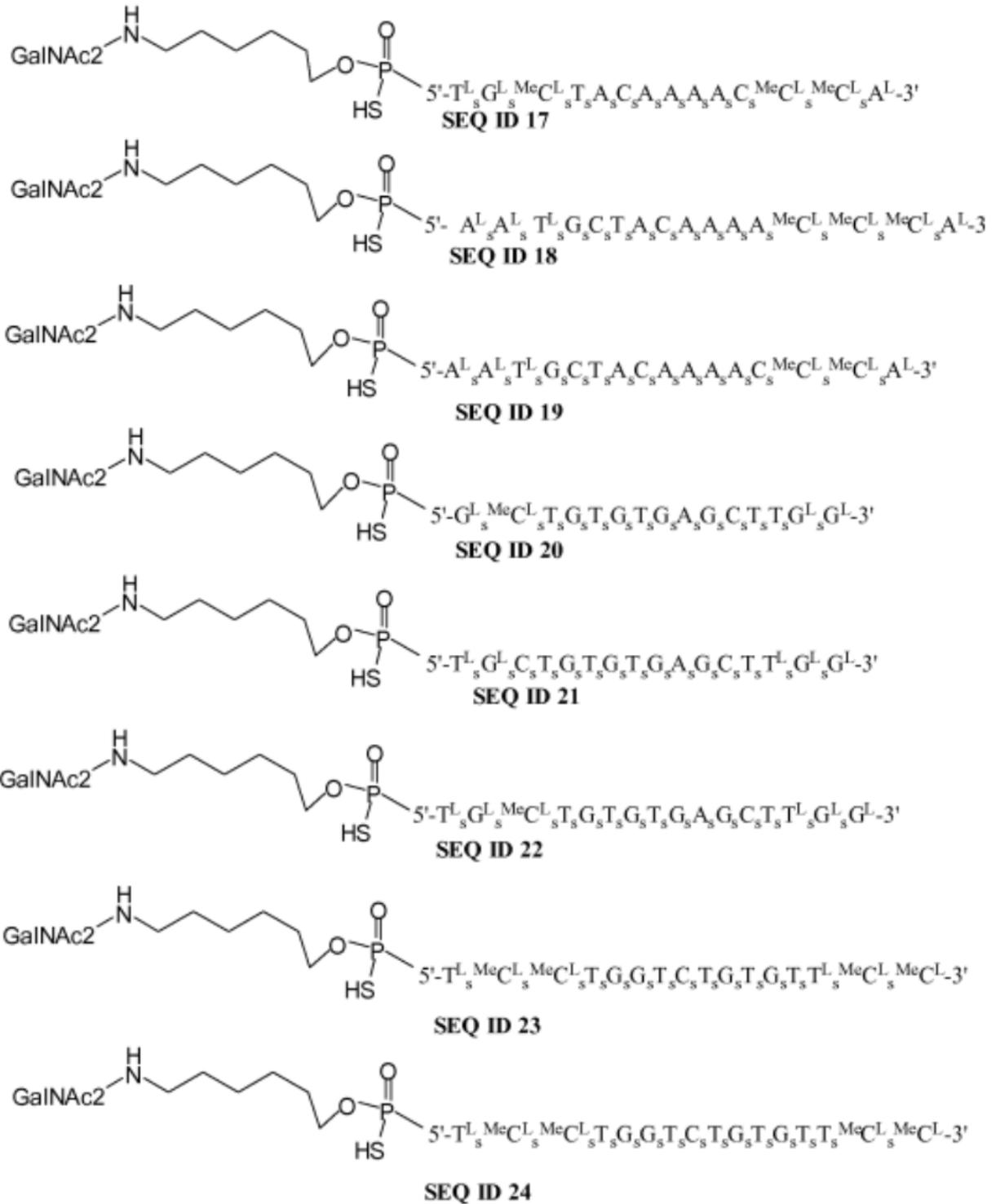


Figura 5A

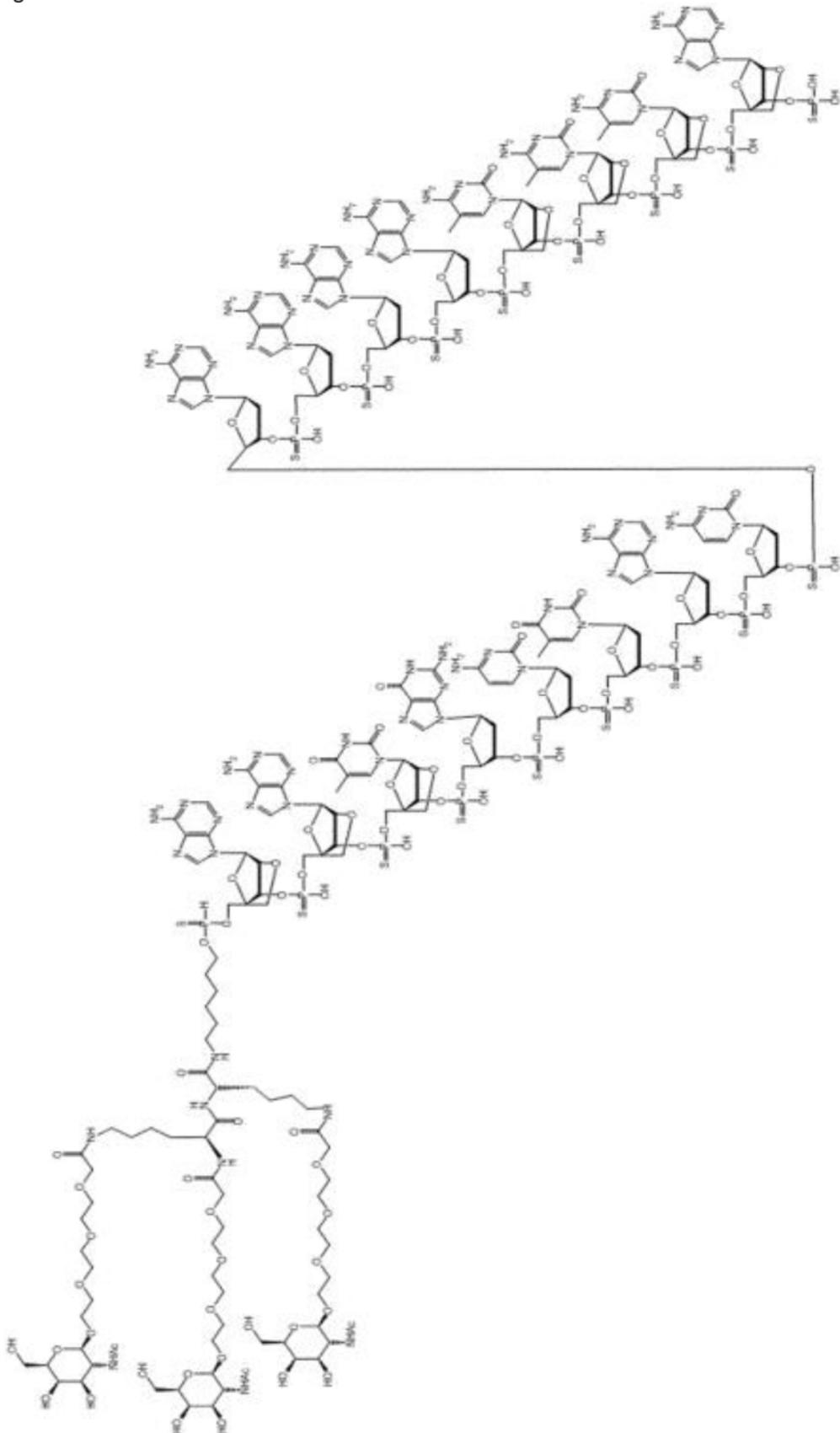


Figura 5B

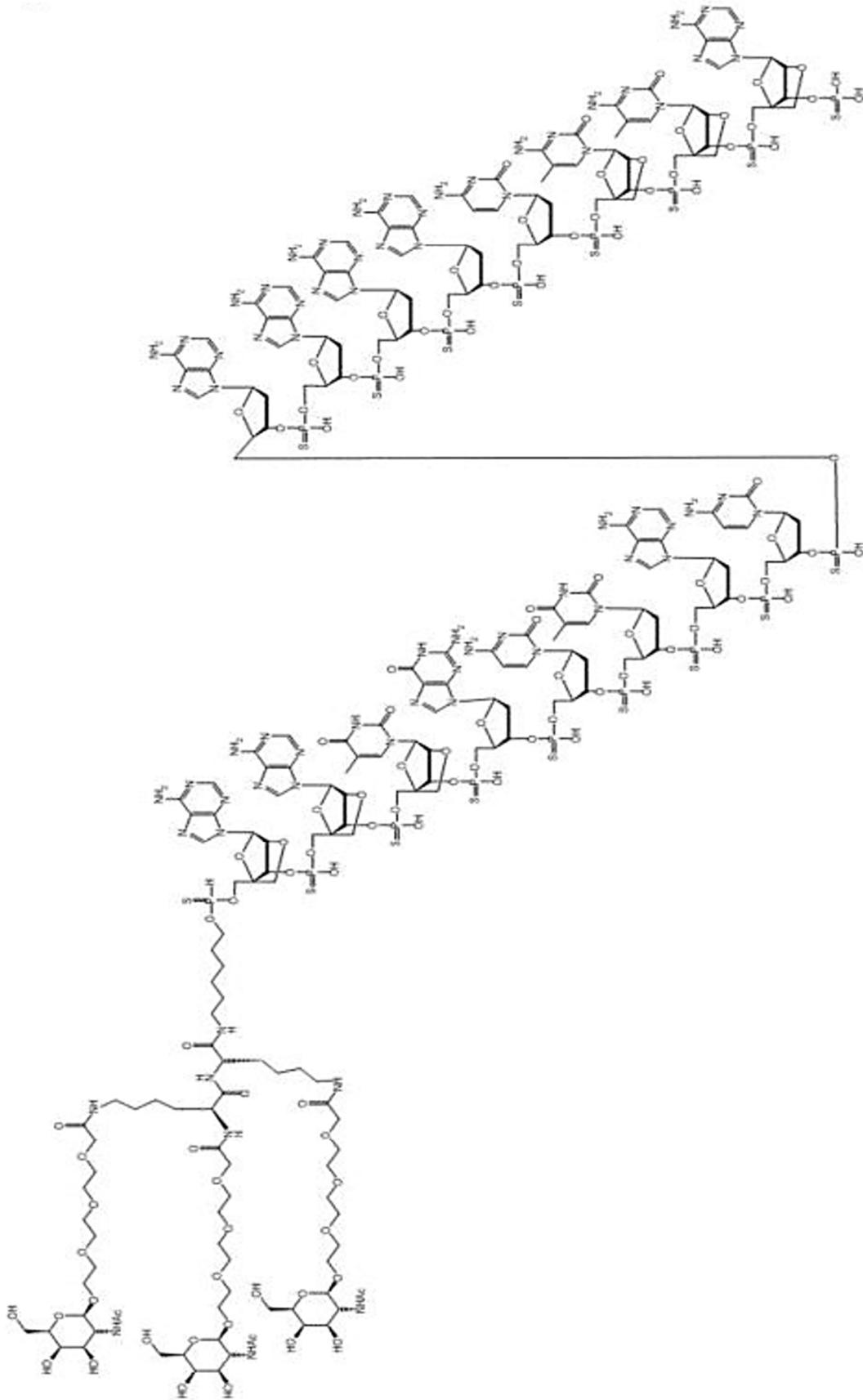


Figura 6

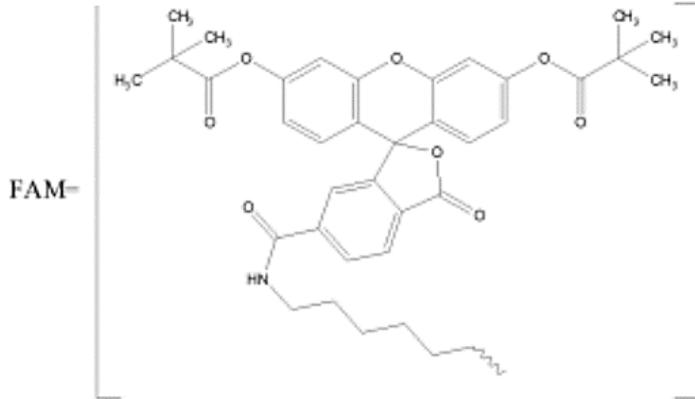


Figura 7

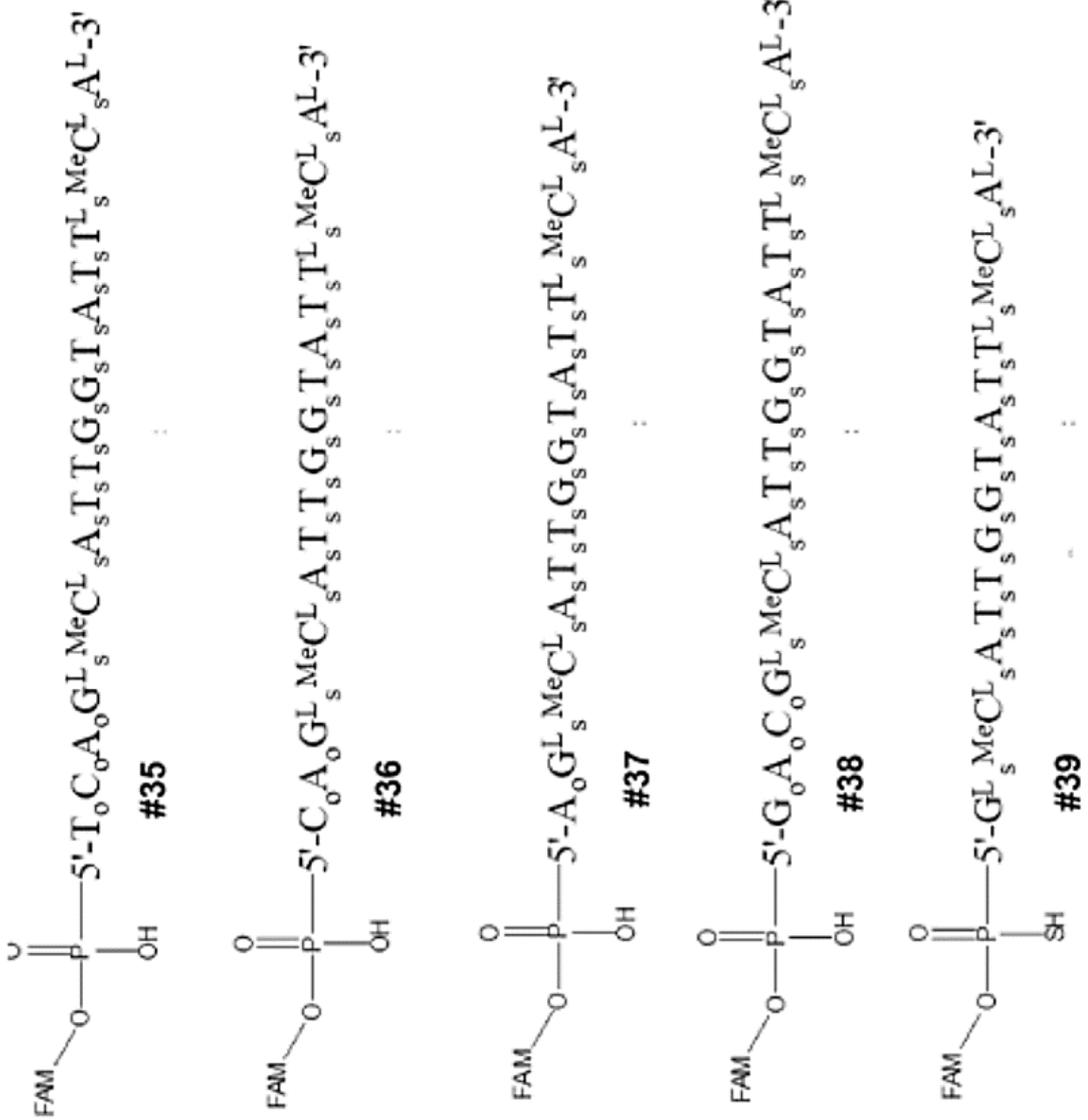


Figura 8

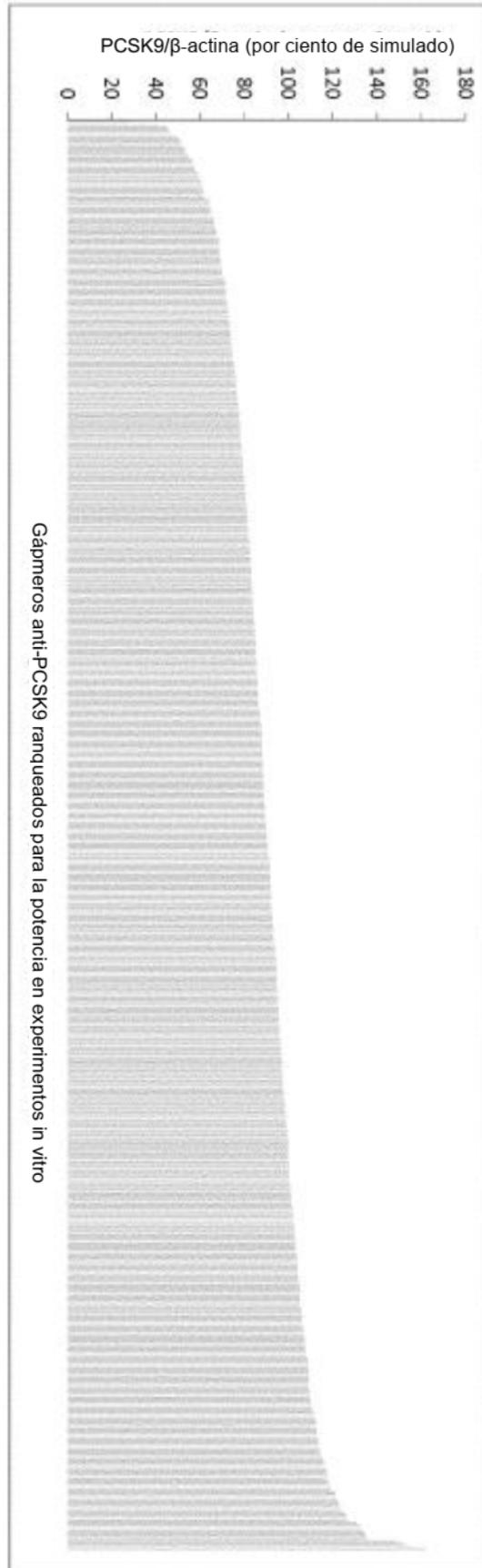


Figura 9

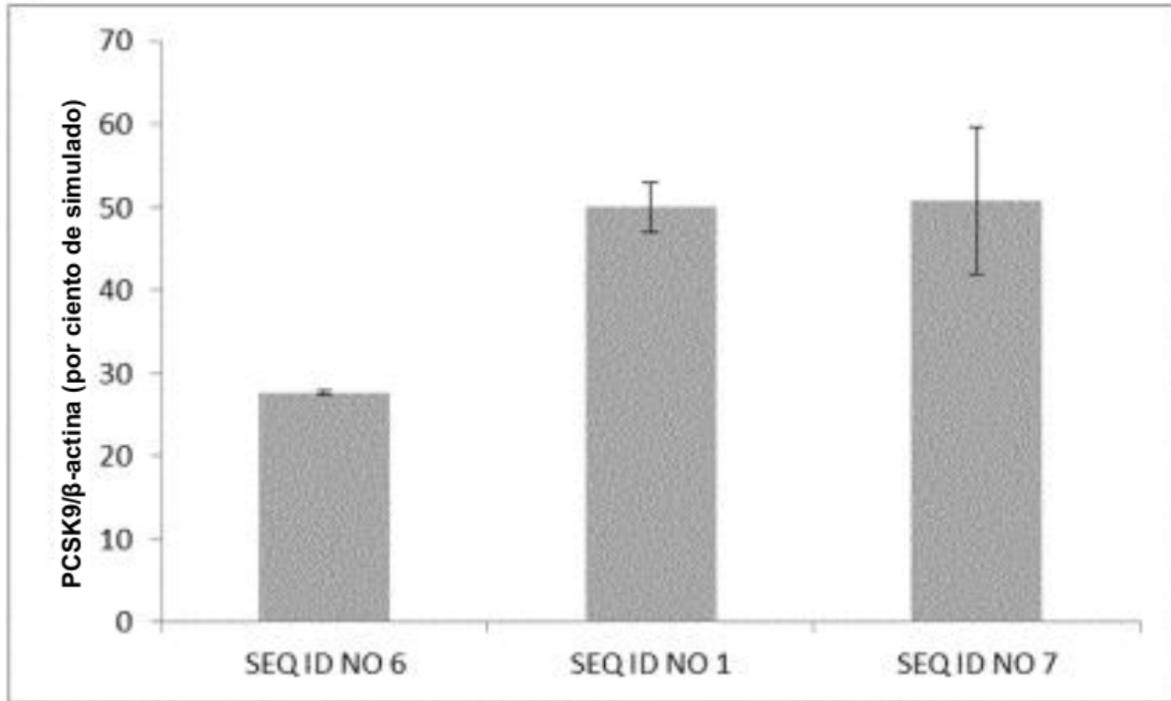


Figura 10

% de ARNm de PCSK9  
con relación a simulado

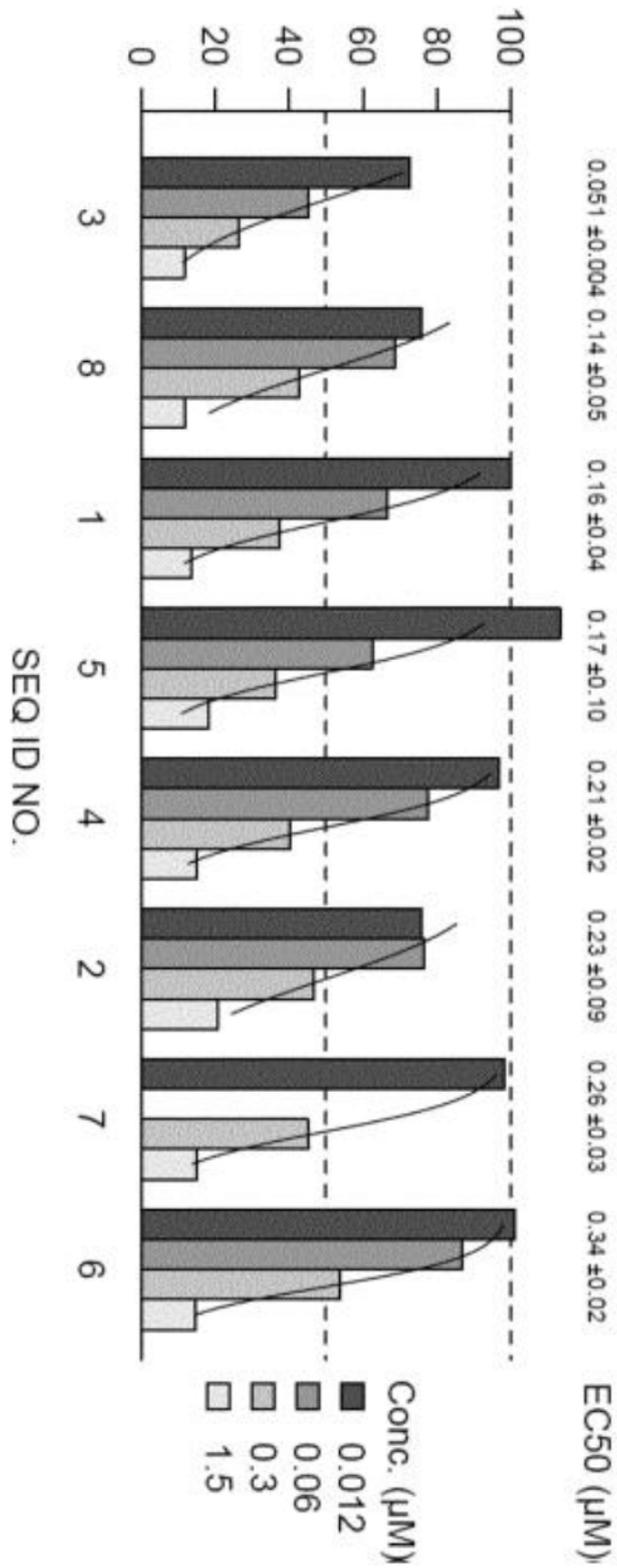


Figura 11

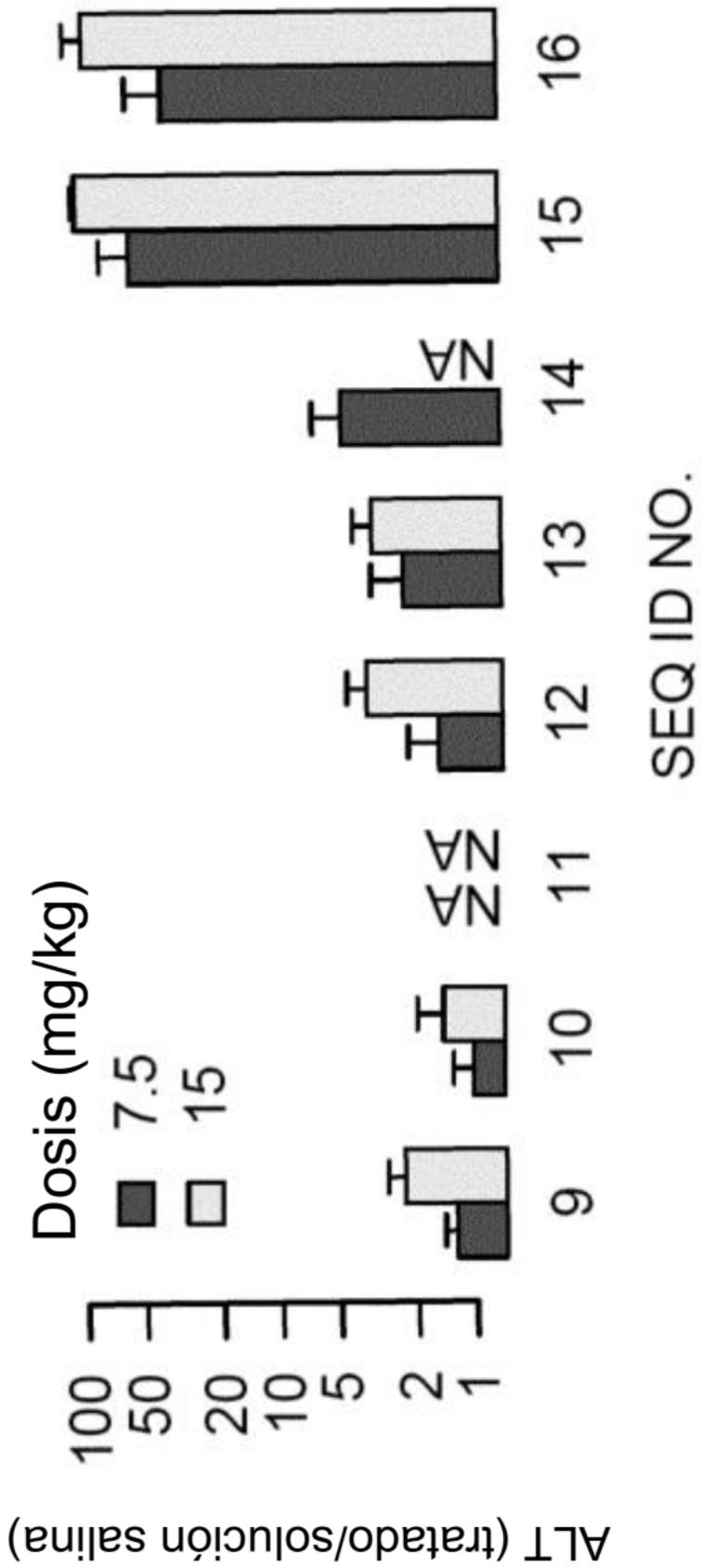


Figura 12

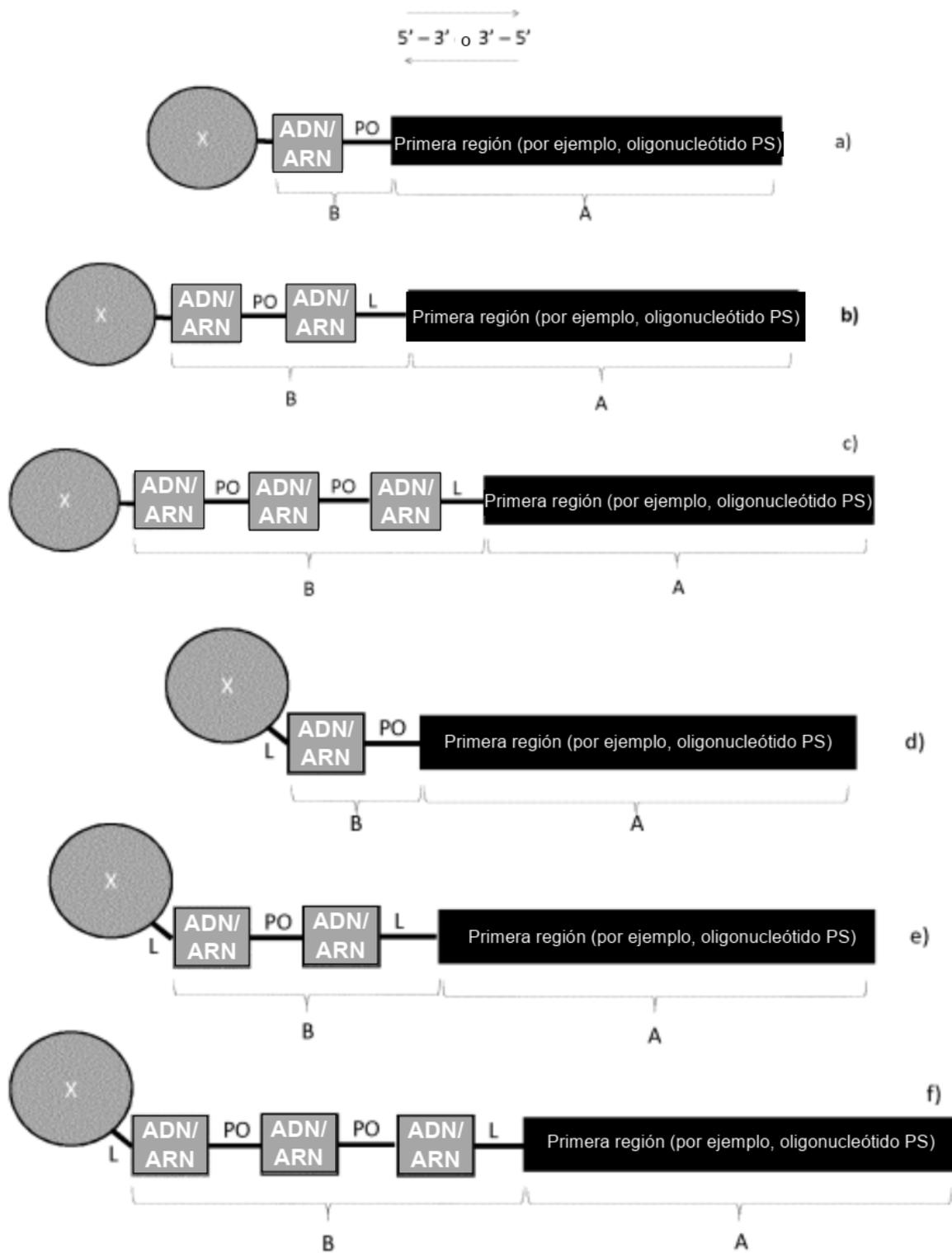


Figura 13

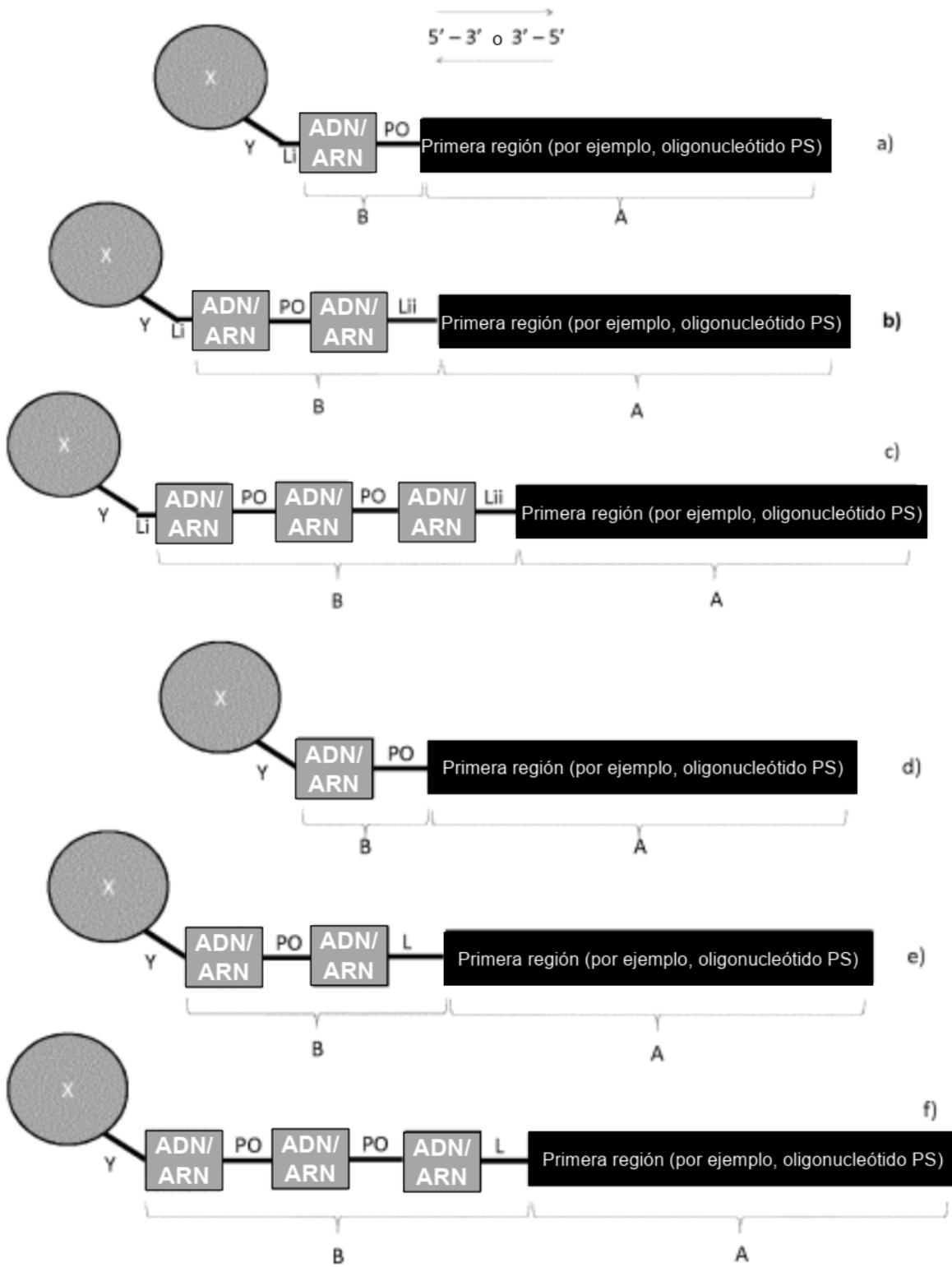
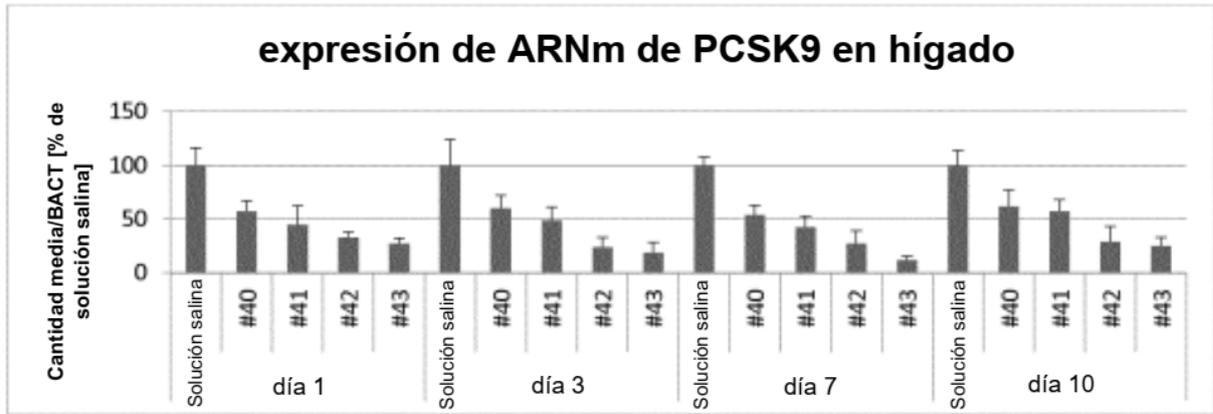


Figura 14

A



B

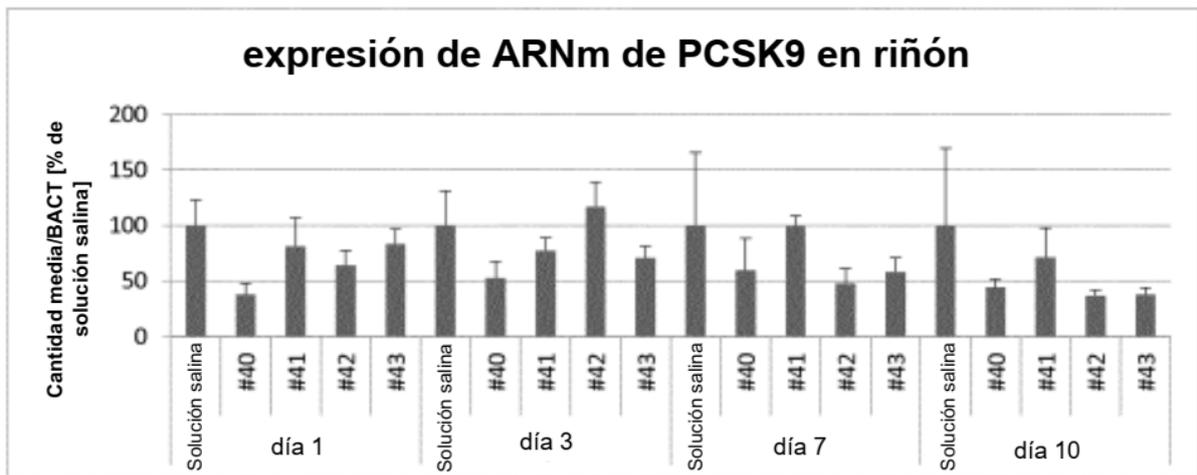


Figura 15

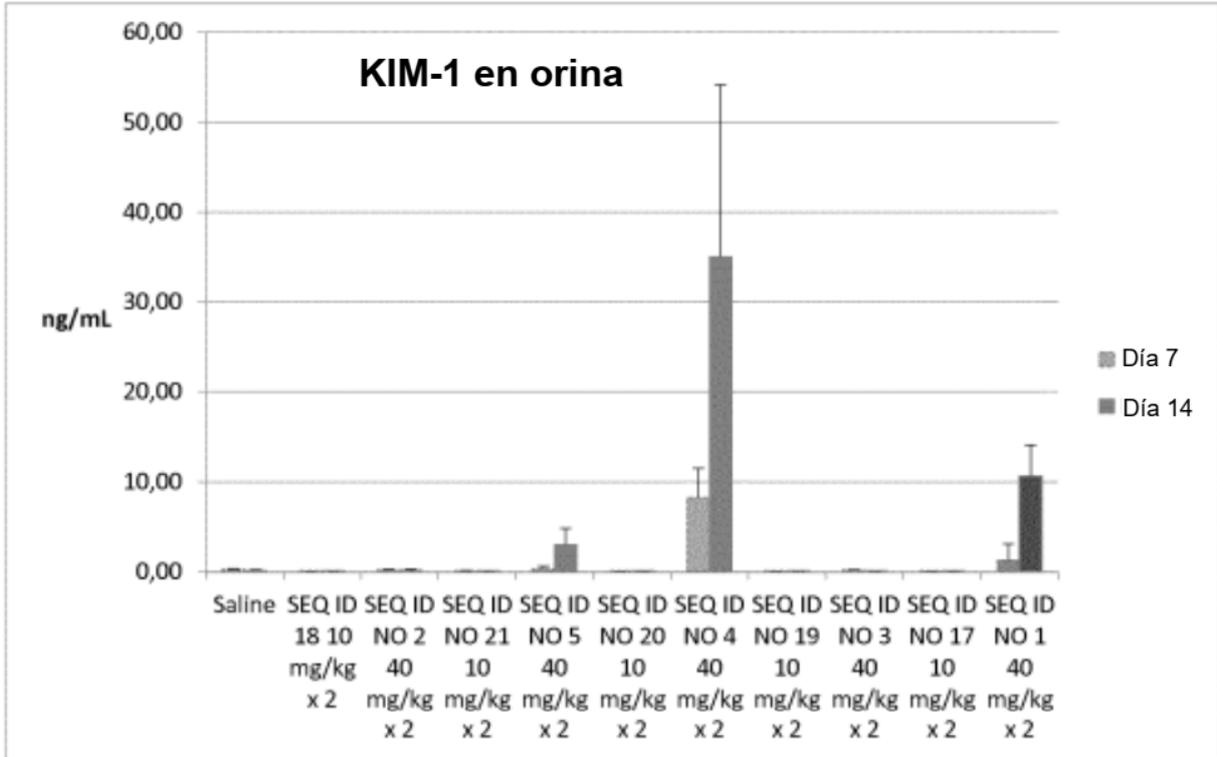


Figura 16

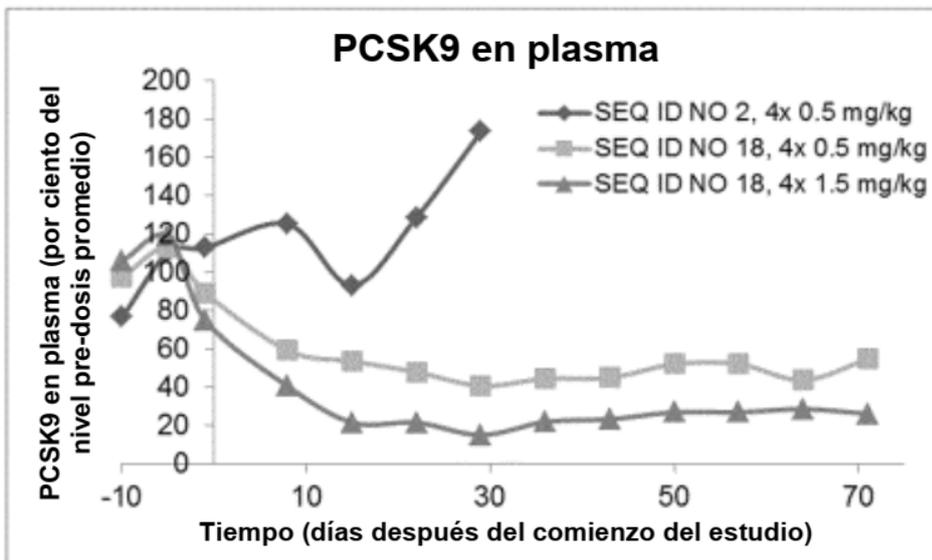


Figura 16 (cont)

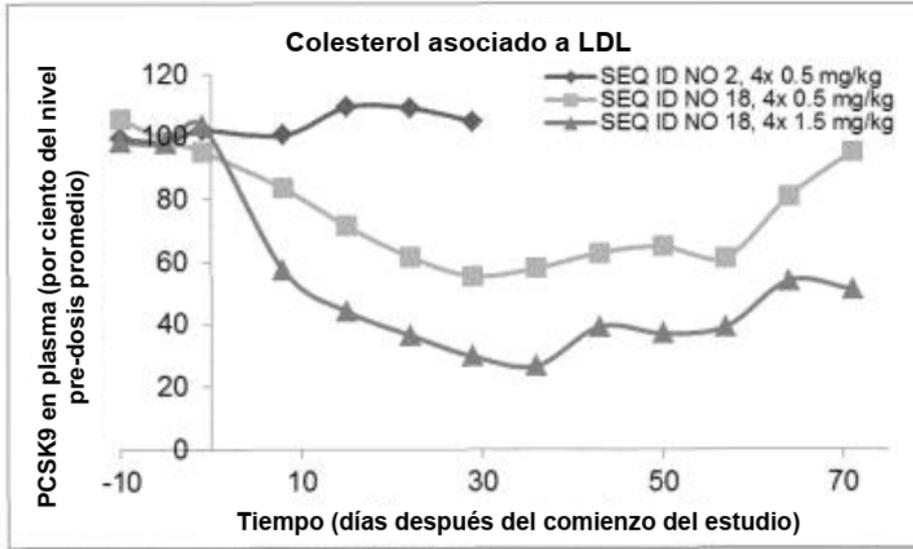


Figura 17

