

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 917 473**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/IB2015/000395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107425**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15719826 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2022 EP 3094728**

54 Título: **Diseño quiral**

30 Prioridad:

**16.01.2014 US 201461928405 P**  
**13.10.2014 US 201462063359 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.07.2022**

73 Titular/es:

**WAVE LIFE SCIENCES LTD. (100.0%)**  
**7 Straits View No. 12-00, Marina One East Tower**  
**Singapore 018936, SG**

72 Inventor/es:

**MEENA;**  
**BUTLER, DAVID;**  
**IWAMOTO, NAOKI;**  
**SVRZIKAPA, NENAD;**  
**VERDINE, GREGORY, L. y**  
**ZLATEV, IVAN**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 917 473 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

Diseño quiral

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos N.º de serie 61/928.405, presentada el 16 de enero de 2014, y a 62/063.359, presentada el 13 de octubre de 2014.

10 **Antecedentes de la invención**

Los oligonucleótidos son útiles en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, de investigación y de nanomateriales. El uso de ácidos nucleicos naturales (por ejemplo, ADN o ARN sin modificar) para terapéuticos puede ser limitado, por ejemplo, debido a su inestabilidad contra nucleasas extra- e intracelulares y/o a su mala penetración y distribución celular. Además, estudios *in vitro* han mostrado que las propiedades de los oligonucleótidos antisentido, tales como la afinidad de unión, la unión específica de secuencia al ARN complementario (Cosstick y Eckstein, 1985; LaPlanche *et al.*, 1986; Latimer *et al.*, 1989; Hacia *et al.*, 1994; Mesmaeker *et al.*, 1995) y la estabilidad a nucleasas se pueden afectar por las configuraciones estereoquímicas absolutas de los átomos de fósforo (Cook, *et al.*, documento de patente US005599797A). Por lo tanto, existe una necesidad de oligonucleótidos nuevos y mejorados y de composiciones de oligonucleótidos, tales como, por ejemplo, nuevos oligonucleótidos antisentido y de ARNip y composiciones de oligonucleótidos. N. Oka *et al.*, Chemical Society Reviews, 2011, vol. 40, pp. 5829-5843, es un artículo de revisión sobre la síntesis estereocontrolada de análogos de oligonucleótidos que contienen átomos de fósforo internucleotídicos quirales. Y. Lu, Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2006, vol. 6, pp. 319-330, es un artículo de revisión sobre la síntesis estereocontrolada de fosforotioatos antisentido. P Guga *et al.*, Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ, USA, 2003, DOI: 10.1002/0471142700.nc0417s14, se refiere a la síntesis de oligonucleótidos de fosforotioato con enlaces fosforotioato estereodefinidos. T. Inagawa *et al.*, FEBS Letters, 2002, vol. 528, pp. 48 a 52, se refiere a la inhibición de la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1 por oligo(nucleósido fosforotioatos) estereodefinidos en P en un modelo de infección a largo plazo. M. Koziolkiewicz *et al.*, FEBS Letters 1998, vol. 434, pp. 77 a 82, se refiere al efecto de la quiralidad en P de oligo(desoxirribonucleósido fosforotioatos) sobre la actividad de desoxirribonucleotidil transferasa terminal.

**Sumario de la invención**

Entre otras cosas, la presente invención engloba el reconocimiento de que preparaciones de oligonucleótidos estereoaleatorios contienen una pluralidad de entidades químicas distintas que se diferencian entre sí en la estructura estereoquímica de centros quirales del esqueleto individuales dentro de la cadena de oligonucleótidos. Además, la presente invención engloba el conocimiento de que es normalmente poco probable que una preparación de oligonucleótidos estereoaleatorios incluya cada estereoisómero posible del oligonucleótido relevante. Por lo tanto, entre otras cosas, la presente invención proporciona nuevas entidades químicas que son estereoisómeros particulares de oligonucleótidos de interés. Es decir, la presente invención proporciona preparaciones sustancialmente puras de compuestos de un único oligonucleótido, donde un compuesto de oligonucleótido particular se puede definir por su secuencia de bases, su longitud, su patrón de enlaces del esqueleto y su patrón de centros quirales del esqueleto.

La presente invención demuestra, entre otras cosas, que los estereoisómeros individuales de un oligonucleótido particular pueden mostrar diferente estabilidad y/o actividad entre sí. Además, la presente divulgación demuestra que las mejoras en la estabilidad logradas mediante la inclusión y/o localización de estructuras quirales particulares dentro de un oligonucleótido pueden ser comparables a, o incluso mejores, que las logradas mediante el uso de ciertos enlaces del esqueleto, bases y/o azúcares modificados (por ejemplo, mediante el uso de ciertos tipos de fosfatos modificados, modificaciones en 2', modificaciones de bases, etc.).

Entre otras cosas, la presente invención reconoce qué propiedades y actividades de un oligonucleótido se pueden ajustar por optimización de su patrón de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos, en donde los oligonucleótidos tienen un patrón común de centros quirales del esqueleto que, inesperadamente, potencia enormemente la estabilidad y/o actividad biológica de los oligonucleótidos. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona una elevada estabilidad. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona una actividad sorprendentemente elevada. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona estabilidad y actividad elevadas. En algunas realizaciones, cuando un oligonucleótido se utiliza para escindir un polímero de ácido nucleico, un patrón de centros quirales del esqueleto del oligonucleótido, sorprendentemente por sí mismo, cambia el patrón de escisión de un polímero de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto previene eficazmente la escisión en sitios secundarios. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto crea nuevos sitios de escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto minimiza el número de sitios de escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto minimiza el número de sitios de escisión de manera que un polímero de ácido nucleico diana se escinda en solo un sitio dentro de la secuencia del polímero de ácido nucleico diana que es complementaria al oligonucleótido. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto potencia la eficiencia de escisión en un sitio de

escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto del oligonucleótido mejora la escisión de un polímero de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto aumenta la selectividad. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto minimiza el efecto inespecífico. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto aumenta la selectividad, por ejemplo, la selectividad de escisión entre dos secuencias diana que se diferencian únicamente por un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto,

composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto; en donde:

la secuencia de bases común tiene al menos 15 bases;

el único oligonucleótido tiene una estructura de ala-núcleo-ala, en donde la primera región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases, y la región de núcleo tiene una longitud de seis o más bases;

la región de núcleo comprende un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de  $(Sp)_m(Rp)_n$  o  $(Rp)_n(Sp)_m$ , en donde  $n$  es 1 y  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

al menos el 40 % de los enlaces internucleotídicos de fosforotioato del único oligonucleótido son de la configuración  $Sp$ .

Las realizaciones preferidas de la invención son las materias de las reivindicaciones dependientes y se describen en toda la presente Descripción y Figuras.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto.

En algunas realizaciones, la primera región de ala tiene una longitud de dos o más bases, preferentemente de cinco o más bases.

En algunas realizaciones, la segunda región de ala tiene una longitud de dos o más bases, preferentemente de cinco o más bases.

En algunas realizaciones, la región de núcleo tiene una longitud de 10 o más bases, preferentemente de 15 o más bases.

En algunas realizaciones, la región de núcleo tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de  $(Sp)_m(Rp)_n$ , en donde  $n$  es 1 y  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

En algunas realizaciones, la región de núcleo tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de SSR.

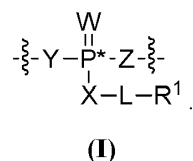
En algunas realizaciones, la región de núcleo tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de  $(Rp)_n(Sp)_m$ , en donde  $n$  es 1 y  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

En algunas realizaciones, el 50 % por ciento o más de los enlaces nucleotídicos quirales de la región de núcleo tienen configuración  $Sp$ .

En algunas realizaciones, un patrón de repetición es un motivo que comprende al menos aproximadamente 75 % de centros quirales del esqueleto en la conformación  $Sp$ .

En algunas realizaciones, al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, todavía más preferentemente al menos el 80 %, lo más preferentemente el 90 %, de los enlaces internucleotídicos de fosforotioato del único oligonucleótido son de la configuración  $Sp$ .

En algunas realizaciones, cada enlace fosfato modificado quiral tiene independientemente la estructura de fórmula I:



5 en donde:

P\* es un átomo de fósforo asimétrico y es o Rp o Sp;

10 W es O, S o Se;

cada uno de X, Y y Z es independientemente -O-, -S-, -N(-L-R<sup>1</sup>)- o L;

15 L es un enlace covalente o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

20 R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

25 cada R' es independientemente -R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, o:

dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido, o

30 dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

35 -Cy- es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbocicileno, arileno, heteroarileno o heterocicileno;

cada R es independientemente hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbociclilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo; y

40 cada



representa independientemente una conexión a un nucleósido.

45 En algunas realizaciones, cada enlace fosfato modificado quiral es un enlace diéster de fosforotioato.

En algunas realizaciones, X es -S- y -L-R<sup>1</sup> no es hidrógeno.

50 En algunas realizaciones, el único oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde W es S.

La invención reivindicada se define en las reivindicaciones adjuntas.

## 55 Definiciones

60 *Alifático*: El término "alifático" o "grupo alifático", como se usa en el presente documento, significa una cadena de hidrocarburo de cadena lineal (es decir, no ramificada) o ramificada, sustituida o sin sustituir, que está completamente saturada o que contiene una o más unidades de insaturación, o un hidrocarburo monocíclico o bicíclico o hidrocarburo policíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático (también denominado en el presente documento "carbociclo", "cicloalifático" o "cicloalquilo"), que tiene un



único punto de unión al resto de la molécula. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-50 átomos de carbono alifático. A menos que se especifique de otro modo, los grupos alifáticos contienen 1-10 átomos de carbono alifático. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-6 átomos de carbono alifático. En algunas realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-5 átomos de carbono alifático. En otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-4 átomos de carbono alifático. En otras realizaciones más, grupos alifáticos contienen 1-3 átomos de carbono alifático, y en aún otras realizaciones, los grupos alifáticos contienen 1-2 átomos de carbono alifático. En algunas realizaciones, "cicloalifático" (o "carbociclo" o "cicloalquilo") se refiere a un hidrocarburo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> monocíclico o bicíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un único punto de unión al resto de la molécula. En algunas realizaciones, "cicloalifático" (o "carbociclo" o "cicloalquilo") se refiere a un hidrocarburo C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> monocíclico que está completamente saturado o que contiene una o más unidades de insaturación, pero que no es aromático, que tiene un único punto de unión al resto de la molécula. Los grupos alifáticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, grupos alquilo, alqueno, alquino lineales o ramificados, sustituidos o sin sustituir, e híbridos de los mismos, tales como (cicloalquil)alquilo, (cicloalqueno)alquilo o (cicloalquino)alquilo.

*Alquileo:* El término "alquileo" se refiere a un grupo alquilo bivalente. Una "cadena de alquileo" es un grupo polimetileno, es decir, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, en donde n es un número entero positivo, preferentemente desde 1 hasta 6, desde 1 hasta 4, desde 1 hasta 3, desde 1 hasta 2, o desde 2 hasta 3. Una cadena de alquileo sustituida es un grupo polimetileno en el que uno o más átomos de hidrógeno del metileno están sustituidos con un sustituyente. Los sustituyentes adecuados incluyen los descritos a continuación para un grupo alifático sustituido.

*Alqueno:* El término "alqueno" se refiere a un grupo alqueno bivalente. Una cadena de alqueno sustituida es un grupo polimetileno que contiene al menos un doble enlace en el que uno o más átomos de hidrógeno están sustituidos con un sustituyente. Los sustituyentes adecuados incluyen los descritos a continuación para un grupo alifático sustituido.

*Animal:* Como se usa en el presente documento, el término "animal" se refiere a cualquier miembro del reino de los animales. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a seres humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En algunas realizaciones, "animal" se refiere a animales no humanos, en cualquier etapa de desarrollo. En ciertas realizaciones, el animal no humano es un mamífero (por ejemplo, un roedor, un ratón, una rata, un conejo, un mono, un perro, un gato, una oveja, ganado vacuno, un primate y/o un cerdo). En algunas realizaciones, los animales incluyen, pero no se limitan a, mamíferos, aves, reptiles, anfibios, peces y/o gusanos. En algunas realizaciones, un animal puede ser un animal transgénico, un animal genéticamente manipulado y/o un clon.

*Aproximadamente:* Como se usa en el presente documento, se considera que los términos "aproximadamente" o "alrededor de" en referencia a un número incluyen, en general, números que entran dentro de un intervalo del 5 %, 10 %, 15 % o 20 % en cualquier dirección (superior a o inferior a) del número, a menos que se establezca de otro modo o sea de otro modo evidente del contexto (excepto donde dicho número fuera inferior al 0 % o superara el 100 % de un valor posible). En algunas realizaciones, el uso del término "aproximadamente" en referencia a dosis significa ± 5 mg/kg/día.

*Ariolo:* El término "ariolo", usado solo o como parte de un resto mayor como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo", se refiere a sistemas de anillos monocíclicos y bicíclicos que tienen un total de cinco a catorce miembros de anillo, en donde al menos un anillo en el sistema es aromático y en donde cada anillo en el sistema contiene tres a siete miembros de anillo. El término "ariolo" se puede usar indistintamente con el término "anillo de ariolo". En ciertas realizaciones de la presente invención, "ariolo" se refiere a un sistema de anillos aromáticos que incluye, pero no se limitan a, fenilo, bifenilo, naftilo, antracilo y similares, que puede poseer uno o más sustituyentes. También está incluido dentro del alcance del término "ariolo", como se usa en el presente documento, un grupo en el que un anillo aromático está condensado con uno o más anillos no aromáticos, tales como indanilo, ftalimidilo, naftimidilo, fenantridinilo o tetrahidronaftilo, y similares.

*Porción característica:* Como se usa en el presente documento, la expresión una "porción característica" de una proteína o polipéptido es una que contiene un tramo continuo de aminoácidos, o un conjunto de tramos continuos de aminoácidos, que juntos son característicos de una proteína o polipéptido. Cada dicho tramo continuo contendrá, en general, al menos dos aminoácidos. Además, los expertos habituales en la técnica apreciarán que normalmente se requieren al menos 5, 10, 15, 20 o más aminoácidos para ser característicos de una proteína. En general, una porción característica es una que, además de la identidad de secuencia especificada anteriormente, comparte al menos una característica funcional con la proteína intacta relevante.

*Secuencia característica:* Una "secuencia característica" es una secuencia que se encuentra en todos los miembros de una familia de polipéptidos o ácidos nucleicos y, por lo tanto, puede ser usada por los expertos habituales en la técnica para definir miembros de la familia.

*Elemento estructural característico:* El término "elemento estructural característico" se refiere a un elemento estructural distintivo (por ejemplo, estructura central, conjunto de datos laterales, elemento de secuencia, etc.) que se encuentra

en todos los miembros de una familia de polipéptidos, moléculas pequeñas o ácidos nucleicos y, por lo tanto, puede ser usado por los expertos habituales en la técnica para definir miembros de la familia.

5 *Comparable*: El término "comparable" se usa en el presente documento para describir dos (o más) conjuntos de condiciones o circunstancias que son suficientemente similares entre sí como para permitir la comparación de resultados obtenidos o fenómenos observados. En algunas realizaciones, conjuntos comparables de condiciones o circunstancias se caracterizan por una pluralidad de características sustancialmente idénticas y uno o un pequeño número de características variadas. Los expertos habituales en la técnica apreciarán que los conjuntos de condiciones son comparables entre sí cuando se caracterizan por un número y tipo suficientes de características sustancialmente idénticas para garantizar una conclusión razonable de que las diferencias en los resultados obtenidos o fenómenos observados en los diferentes conjuntos de condiciones o circunstancias son causadas por o indicativas de la variación en las características que se varían.

15 *Pauta posológica*: Como se usa en el presente documento, una "pauta posológica" o "pauta terapéutica" se refiere a un conjunto de dosis unitarias (normalmente más de una) que se administra individualmente a un sujeto, normalmente separadas por periodos de tiempo. En algunas realizaciones, un agente terapéutico dado tiene una pauta posológica recomendada, que puede implicar una o más dosis. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis separadas entre sí por un periodo de tiempo de la misma longitud; en algunas realizaciones, una pauta posológica dada comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de una pauta posológica son de la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas realizaciones, dosis diferentes dentro de una pauta posológica son de diferentes cantidades. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida por una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida por una o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis igual a la primera cantidad de dosis.

30 *Agentes equivalentes*: Los expertos habituales en la técnica, que leen la presente divulgación, apreciarán que el alcance de los agentes útiles en el contexto de la presente invención no se limita a aquellos mencionados o ejemplificados específicamente en el presente documento. En particular, los expertos en la técnica reconocerán que los agentes activos tienen normalmente una estructura que consiste en un núcleo y restos laterales unidos, y además apreciarán que variaciones simples de dicho núcleo y/o restos laterales pueden no alterar significativamente la actividad del agente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la sustitución de uno o más restos laterales con grupos de estructura tridimensional comparable y/o características de reactividad química puede generar un compuesto sustituido o porción equivalente a un compuesto o porción de referencia parental. En algunas realizaciones, la adición o retirada de uno o más restos laterales puede generar un compuesto sustituido equivalente a un compuesto de referencia parental. En algunas realizaciones, la alteración de la estructura de núcleo, por ejemplo mediante la adición o retirada de un pequeño número de enlaces (normalmente no más de 5, 4, 3, 2 o 1 enlaces, y frecuentemente solo un enlace sencillo) puede generar un compuesto sustituido equivalente a un compuesto de referencia parental. En muchas realizaciones, se pueden preparar compuestos equivalentes por métodos ilustrados en los esquemas de reacción generales como, por ejemplo, se describen a continuación, o por modificaciones de los mismos, usando materiales de partida fácilmente disponibles, reactivos y procedimientos de síntesis convencionales o proporcionados. En estas reacciones, también es posible hacer uso de variantes, que son en sí mismas conocidas, pero no se mencionan aquí.

45 *Dosis equivalente*: El término "dosis equivalente" se usa en el presente documento para comparar dosis de diferentes agentes farmacéuticamente activos que efectúan el mismo resultado biológico. Se considera que la dosis de dos agentes diferentes es "equivalente" entre sí según la presente invención si logran un nivel o grado comparable de resultado biológico. En algunas realizaciones, las dosis equivalentes de diferentes agentes farmacéuticos para su uso según la presente invención se determinan usando ensayos *in vitro* y/o *in vivo* como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se utilizan uno o más agentes de activación lisosómicos para su uso según la presente invención en dosis equivalentes a una dosis de un agente de activación lisosómico de referencia; en algunas de dichas realizaciones, el agente de activación lisosómico de referencia para dicho fin se selecciona del grupo que consiste en activadores alostéricos de molécula pequeña (por ejemplo, pirazolpirimidinas), iminoazúcares (por ejemplo, isofagomina), antioxidantes (por ejemplo, n-acetil-cisteína) y reguladores del tráfico celular (por ejemplo, polipéptido Rab1a).

60 *Heteroalifático*: El término "heteroalifático" se refiere a un grupo alifático en donde una o más unidades seleccionadas de C, CH, CH<sub>2</sub> o CH<sub>3</sub> se sustituyen independientemente con un heteroátomo. En algunas realizaciones, un grupo heteroalifático es heteroalquilo. En algunas realizaciones, un grupo heteroalifático es heteroalqueno.

65 *Heteroarilo*: Los términos "heteroarilo" y "heteroar-", usados solos o como parte de un resto más grande, por ejemplo, "heteroaralquilo" o "heteroaralcoxi", se refieren a grupos que tienen 5 a 10 átomos de anillo, preferentemente 5, 6 o 9 átomos de anillo; que tienen 6, 10 o 14 electrones  $\pi$  compartidos en una matriz cíclica; y que tienen, además de átomos de carbono, de uno a cinco heteroátomos. El término "heteroátomo" se refiere a nitrógeno, oxígeno o azufre, e incluye cualquier forma oxidada del nitrógeno o azufre, y cualquier forma cuaternizada de un nitrógeno básico. Los grupos heteroarilo incluyen, sin limitación, tienilo, furanilo, pirrolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, tetrazolilo, oxazolilo,

isoxazolilo, oxadiazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, tiadiazolilo, piridilo, piridazinilo, pirimidinilo, pirazinilo, indolizínilo, purínilo, naftiridinilo y pteridinilo. Los términos "heteroarilo" y "heteroar-", como se usan en el presente documento, también incluyen grupos en los que un anillo heteroaromático está condensado con uno o más anillos de arilo, cicloalifáticos o de heterociclilo, donde el radical o punto de unión está en el anillo heteroaromático. Los ejemplos no limitantes incluyen indolilo, isoindolilo, benzotienilo, benzofuranilo, dibenzofuranilo, indazolilo, bencimidazolilo, benzotiazolilo, quinolilo, isoquinolilo, cinolinilo, ftalazinilo, quinazolinilo, quinoxalinilo, 4*H*-quinolizínilo, carbazolilo, acridinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, fenoxazinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo y pirido[2,3-*b*]-1,4-oxazin-3(4*H*)-ona. Un grupo heteroarilo puede ser mono- o bicíclico. El término "heteroarilo" se puede usar indistintamente con los términos "anillo de heteroarilo", "grupo heteroarilo" o "heteroaromático", cualquiera de cuyos términos incluye anillos que están opcionalmente sustituidos. El término "heteroaralquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un heteroarilo, en donde las porciones de alquilo y heteroarilo están independientemente opcionalmente sustituidas.

**Heteroátomo:** El término "heteroátomo" significa uno o más de oxígeno, azufre, nitrógeno, fósforo, boro, selenio o silicio (incluyendo cualquier forma oxidada del nitrógeno, boro, selenio, azufre, fósforo o silicio; la forma cuaternizada de cualquier nitrógeno básico o; un nitrógeno sustituible de un anillo heterocíclico, por ejemplo N (como en 3,4-dihidro-2*H*-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o NR<sup>+</sup> (como en pirrolidinilo N-sustituido)).

**Heterociclo:** Como se usa en el presente documento, los términos "heterociclo", "heterociclilo", "radical heterocíclico" y "anillo heterocíclico" se usan indistintamente y se refieren a un resto heterocíclico estable monocíclico de 3 a 7 miembros o bicíclico de 7-10 miembros que está o saturado o parcialmente insaturado, y que tiene, además de átomos de carbono, uno o más, preferentemente uno a cuatro, heteroátomos, como se ha definido anteriormente. Cuando se usa en referencia a un átomo de anillo de un heterociclo, el término "nitrógeno" incluye un nitrógeno sustituido. Como un ejemplo, en un anillo saturado o parcialmente insaturado que tiene 0-3 heteroátomos seleccionados de oxígeno, azufre o nitrógeno, el nitrógeno puede ser N (como en 3,4-dihidro-2*H*-pirrolilo), NH (como en pirrolidinilo) o <sup>+</sup>NR (como en pirrolidinilo *N*-sustituido).

Un anillo heterocíclico se puede unir a su grupo lateral en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que produzca una estructura estable y cualquiera de los átomos de anillo puede estar opcionalmente sustituido. Los ejemplos de dichos radicales heterocíclicos saturados o parcialmente insaturados incluyen, sin limitación, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofenilo, pirrolidinilo, piperidinilo, pirrolinilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, oxazolidinilo, piperazinilo, dioxanilo, dioxolanilo, diazepinilo, oxazepinilo, tiazepinilo, morfolinilo y quinuclidinilo. Los términos "heterociclo", "heterociclilo", "anillo heterociclilo", "grupo heterocíclico", "resto heterocíclico" y "radical heterocíclico" se usan indistintamente en el presente documento, y también incluyen grupos en los que un anillo heterociclilo está condensado con uno o más anillos de arilo, heteroarilo o cicloalifáticos, tales como indolinilo, 3*H*-indolilo, cromanilo, fenantridinilo o tetrahidroquinolinilo, donde el radical o punto de unión está en el anillo heterociclilo. Un grupo heterociclilo puede ser mono- o bicíclico. El término "heterociclilalquilo" se refiere a un grupo alquilo sustituido con un heterociclilo, en donde las porciones de alquilo y heterociclilo están independientemente están opcionalmente sustituidas.

**Intraperitoneal:** Las expresiones "administración intraperitoneal" y "administrado por vía intraperitoneal", como se usan en el presente documento, tienen su significado entendido en la técnica con referencia a la administración de un compuesto o composición en el peritoneo de un sujeto.

**In vitro:** Como se usa en el presente documento, el término "*in vitro*" se refiere a acontecimientos que ocurren en un entorno artificial, por ejemplo, en un tubo de ensayo o recipiente de reacción, en cultivo celular, etc., en vez de dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta y/o microbio).

**In vivo:** Como se usa en el presente documento, el término "*in vivo*" se refiere a acontecimientos que ocurren dentro de un organismo (por ejemplo, animal, planta y/o microbio).

**Alquilo inferior:** El término "alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado. Los grupos alquilo inferior a modo de ejemplo son metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo.

**Haloalquilo inferior:** El término "haloalquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo C<sub>1-4</sub> lineal o ramificado que está sustituido con uno o más átomos de halógeno.

**Opcionalmente sustituido:** Como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención pueden contener restos "opcionalmente sustituidos". En general, el término "sustituido", tanto si va precedido por el término "opcionalmente" como no, significa que uno o más hidrógenos del resto diseñado están sustituidos con un sustituyente adecuado. A menos que se indique lo contrario, un grupo "opcionalmente sustituido" puede tener un sustituyente adecuado en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada se pueda sustituir con más de un sustituyente seleccionado de un grupo especificado, el sustituyente puede ser o el mismo o diferente en cada posición. Las combinaciones de sustituyentes previstas por la presente invención son preferentemente las que producen la formación de compuestos estables o químicamente factibles. El término "estable", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no son sustancialmente alterados cuando se

someten a condiciones para permitir su producción, detección y, en ciertas realizaciones, su recuperación, purificación y uso para uno o más de los fines desvelados en el presente documento.

5 Los sustituyentes monovalentes adecuados en un átomo de carbono sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" son independientemente halógeno;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OR}^\circ$ ;  $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-4}\text{R}^\circ$ ;  $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{CH}(\text{OR}^\circ)_2$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{Ph}$ , que se puede sustituir con  $\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$  que se puede sustituir con  $\text{R}^\circ$ ;  $-\text{CH}=\text{CHPh}$ , que se puede sustituir con  $\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}$ -piridilo que se puede sustituir con  $\text{R}^\circ$ ;  $-\text{NO}_2$ ;  $-\text{CN}$ ;  $-\text{N}_3$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)_2$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{S})\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{S})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{N}(\text{R}^\circ)\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{C}(\text{S})\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{SR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{OSiR}^\circ_3$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{OC}(\text{O})(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SR}$ ;  $-\text{SC}(\text{S})\text{SR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SC}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{C}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{C}(\text{S})\text{SR}^\circ$ ;  $-\text{SC}(\text{S})\text{SR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OC}(\text{O})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$ ;  $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{C}(\text{NOR}^\circ)\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{SSR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^\circ$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{OS}(\text{O})_2\text{R}^\circ$ ;  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$ ;  $-(\text{CH}_2)_{0-4}\text{S}(\text{O})\text{R}^\circ$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{N}(\text{R}^\circ)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\circ$ ;  $-\text{N}(\text{OR}^\circ)\text{R}^\circ$ ;  $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\circ_2$ ;  $-\text{P}(\text{O})_2\text{R}^\circ$ ;  $-\text{P}(\text{O})\text{R}^\circ_2$ ;  $-\text{OP}(\text{O})\text{R}^\circ_2$ ;  $-\text{OP}(\text{O})(\text{OR}^\circ)_2$ ;  $-\text{SiR}^\circ_3$ ;  $-(\text{alquilen } \text{C}_{1-4} \text{ lineal o ramificado})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$ ; o  $-(\text{alquilen } \text{C}_{1-4} \text{ lineal o ramificado})\text{C}(\text{O})\text{O}-\text{N}(\text{R}^\circ)_2$ , en donde cada  $\text{R}^\circ$  se puede sustituir como se define a continuación y es independientemente hidrógeno, alifático  $\text{C}_{1-6}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ ,  $-\text{CH}_2-$ (anillo de heteroarilo de 5-6 miembros), o un anillo de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de  $\text{R}^\circ$ , tomadas conjuntamente con su(s) átomo(s) intermedio(s), forman un anillo de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado, o de arilo mono- o bicíclico que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, que se puede sustituir como se define a continuación.

15 Los sustituyentes monovalentes adecuados en  $\text{R}^\circ$  (o el anillo formado tomando dos apariciones independientes de  $\text{R}^\circ$  junto con sus átomos intermedios), son independientemente halógeno,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{R}^\circ$ ,  $-(\text{haloR}^\circ)$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{OR}^\circ$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{CH}(\text{OR}^\circ)_2$ ;  $-\text{O}(\text{haloR}^\circ)$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{N}_3$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{R}^\circ$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SR}^\circ$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{SH}$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NH}_2$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NHR}^\circ$ ,  $-(\text{CH}_2)_{0-2}\text{NR}^\circ_2$ ,  $-\text{NO}_2$ ,  $-\text{SiR}^\circ_3$ ,  $-\text{OSiR}^\circ_3$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{SR}^\circ$ ,  $-(\text{alquilen } \text{C}_{1-4} \text{ lineal o ramificado})\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ , o  $-\text{SSR}^\circ$  en donde cada  $\text{R}^\circ$  está sin sustituir o donde va precedido por "halo" está sustituido solo con uno o más halógenos, y está seleccionado independientemente de alifático  $\text{C}_{1-4}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ , o un anillo de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado, o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de  $\text{R}^\circ$  incluyen  $=\text{O}$  y  $=\text{S}$ .

25 Los sustituyentes divalentes adecuados en un átomo de carbono saturado de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen los siguientes:  $=\text{O}$ ,  $=\text{S}$ ,  $=\text{NNR}^\circ_2$ ,  $=\text{NNHC}(\text{O})\text{R}^\circ$ ,  $=\text{NNHC}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ,  $=\text{NNHS}(\text{O})_2\text{R}^\circ$ ,  $=\text{NR}^\circ$ ,  $=\text{NOR}^\circ$ ,  $-\text{O}(\text{C}(\text{R}^\circ_2))_{2-3}\text{O}-$  o  $-\text{S}(\text{C}(\text{R}^\circ_2))_{2-3}\text{S}-$ , en donde cada aparición independiente de  $\text{R}^\circ$  se selecciona de hidrógeno, alifático  $\text{C}_{1-6}$  que se puede sustituir como se define a continuación, o un anillo sin sustituir de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. Los sustituyentes divalentes adecuados que están unidos a carbonos sustituibles vecinales de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen:  $-\text{O}(\text{CR}^\circ_2)_{2-3}\text{O}-$ , en donde cada aparición independiente de  $\text{R}^\circ$  se selecciona de hidrógeno, alifático  $\text{C}_{1-6}$  que se puede sustituir como se define a continuación, o un anillo sin sustituir de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

30 Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de  $\text{R}^\circ$  incluyen halógeno,  $-\text{R}^\circ$ ,  $-(\text{haloR}^\circ)$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}^\circ$ ,  $-\text{O}(\text{haloR}^\circ)$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\circ$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}^\circ$ ,  $-\text{NR}^\circ_2$  o  $-\text{NO}_2$ , en donde cada  $\text{R}^\circ$  está sin sustituir o donde va precedido por "halo" está sustituido solo con uno o más halógenos, y es independientemente alifático  $\text{C}_{1-4}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ , o un anillo de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

35 Los sustituyentes adecuados en un nitrógeno sustituible de un grupo "opcionalmente sustituido" incluyen  $-\text{R}^\dagger$ ,  $-\text{NR}^\dagger_2$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\dagger$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{R}^\dagger$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$ ,  $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}^\dagger_2$ ,  $-\text{C}(\text{S})\text{NR}^\dagger_2$ ,  $-\text{C}(\text{NH})\text{NR}^\dagger_2$  o  $-\text{N}(\text{R}^\dagger)\text{S}(\text{O})_2\text{R}^\dagger$ ; en donde cada  $\text{R}^\dagger$  es independientemente hidrógeno, alifático  $\text{C}_{1-6}$  que se puede sustituir como se define a continuación,  $-\text{OPh}$  sin sustituir, o un anillo sin sustituir de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre, o, a pesar de la definición anterior, dos apariciones independientes de  $\text{R}^\dagger$ , tomadas conjuntamente con su(s) átomo(s) intermedio(s), forman un anillo mono- o bicíclico sin sustituir de 3-12 miembros saturado, parcialmente insaturado, o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

40 Los sustituyentes adecuados en el grupo alifático de  $\text{R}^\dagger$  son independientemente halógeno,  $-\text{R}^\dagger$ ,  $-(\text{haloR}^\dagger)$ ,  $-\text{OH}$ ,  $-\text{OR}^\dagger$ ,  $-\text{O}(\text{haloR}^\dagger)$ ,  $-\text{CN}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ ,  $-\text{C}(\text{O})\text{OR}^\dagger$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{NHR}^\dagger$ ,  $-\text{NR}^\dagger_2$  o  $-\text{NO}_2$ , en donde cada  $\text{R}^\dagger$  está sin sustituir o donde va precedido por "halo" está sustituido solo con uno o más halógenos, y es independientemente alifático  $\text{C}_{1-4}$ ,  $-\text{CH}_2\text{Ph}$ ,  $-\text{O}(\text{CH}_2)_{0-1}\text{Ph}$ , o un anillo de 5-6 miembros saturado, parcialmente insaturado o de arilo que tiene 0-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

*Oral:* Las expresiones "administración por vía oral" y "administrado por vía oral", como se usan en el presente documento, tienen su significado entendido en la técnica con referencia a la administración por la boca de un compuesto o composición.

5 *Parenteral:* Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", como se usan en el presente documento, tienen su significado entendido en la técnica con referencia a modos de administración distintos de administración enteral y tópica, normalmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección intravenosa, intramuscular, intrarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intrarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal, e  
10 infusión.

*Parcialmente insaturado:* Como se usa en el presente documento, el término "parcialmente insaturado" se refiere a un resto de anillo que incluye al menos un doble o triple enlace. El término "parcialmente insaturado" pretende englobar anillos que tienen múltiples sitios de insaturación, pero no pretende incluir restos arilo o heteroarilo, como se define en  
15 el presente documento.

*Composición farmacéutica:* Como se usa en el presente documento, el término "composición farmacéutica" se refiere a un agente activo, formulado junto con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, el agente activo está presente en una cantidad de dosis unitaria apropiada para administración en una pauta terapéutica que muestra una probabilidad estadísticamente significativa de lograr un efecto terapéutico predeterminado cuando se administra a una población relevante. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden ser especialmente formuladas para administración en forma sólida o líquida, que incluyen las adaptadas para lo siguiente: administración por vía oral, por ejemplo, rociados (disoluciones o suspensiones acuosas o no acuosas), comprimidos, por ejemplo, los dirigidos para absorción bucal, sublingual y sistémica, bolos, polvos, gránulos, pastas para aplicación a la lengua; administración parenteral, por ejemplo, por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o epidural como, por ejemplo, una disolución o suspensión estéril, o formulación de liberación sostenida; administración tópica, por ejemplo, como una crema, pomada, o un parche de liberación controlada o spray aplicado a la piel, los pulmones o la cavidad bucal; por vía intravaginal o por vía intrarrectal, por ejemplo, como un pesario, crema o espuma; por vía sublingual; por vía ocular; por vía transdérmica; o por vía nasal, pulmonar, y a otras superficies mucosas.  
20  
25  
30

*Farmacéuticamente aceptable:* Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, dentro del alcance de criterio médico sensato, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable.  
35

*Vehículo farmacéuticamente aceptable:* Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, o material de encapsulación de disolvente, implicado en llevar o transportar el compuesto objeto de un órgano, o porción del cuerpo, a otro órgano, o porción del cuerpo. Cada vehículo debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los otros componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir de vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuate, aceite de semilla de algodón, aceite de alazor, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes de tamponamiento, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua sin pirógenos; solución salina isotónica; disolución de Ringer; alcohol etílico; disoluciones de pH tamponado; poliésteres, policarbonatos y/o polianhídridos; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en las formulaciones farmacéuticas.  
40  
45  
50

*Sal farmacéuticamente aceptable:* El término "sal farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a sales de dichos compuestos que son apropiadas para su uso en contextos farmacéuticos, es decir, sales que están dentro del alcance del criterio médico sensato, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, y son proporcionales a una relación beneficio/riesgo razonable. Se conocen bien en la técnica las sales farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, S. M. Berge, et al. describen sales farmacéuticamente aceptables con detalle en J. Pharmaceutical Sciences, 66: 1-19 (1977). En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de ácido no tóxicas, que son sales de un grupo amino formado con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico, o con ácidos orgánicos, tales como ácido acético, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico, o usando otros métodos usados en la técnica, tales como intercambio iónico. En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, las sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato,  
55  
60  
65

digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, *p*-toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. En algunas realizaciones, las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, cuando convenga, cationes amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos formados usando contraiones, tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, alquilo que tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, sulfonato y arilsulfonato.

*Profármaco:* En general, un "profármaco", como se usa el término en el presente documento y como es entendido en la técnica, es una entidad que, cuando se administra a un organismo, es metabolizado en el cuerpo para administrar un agente activo (por ejemplo, terapéutico o de diagnóstico) de interés. Normalmente, dicho metabolismo implica la retirada de al menos un "resto de profármaco", de manera que se forme el agente activo. Se conocen en la técnica diversas formas de "profármacos". Para ejemplos de dichos restos de profármaco, véase:

- a) Design of Prodrugs, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985) y Methods in Enzymology, 42:309-396, editado por K. Widder, et al. (Academic Press, 1985);
- b) Prodrugs and Targeted Delivery, editado por J. Rautio (Wiley, 2011);
- c) Prodrugs and Targeted Delivery, editado por J. Rautio (Wiley, 2011);
- d) A Textbook of Drug Design and Development, editado por Krogsgaard-Larsen;
- e) Bundgaard, Capítulo 5 "Design and Application of Prodrugs", por H. Bundgaard, p. 113-191 (1991);
- f) Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8:1-38 (1992);
- g) Bundgaard, et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77:285 (1988); y
- h) Kakeya, et al., Chem. Pharm. Bull., 32:692 (1984).

Al igual que con otros compuestos descritos en el presente documento, los profármacos se pueden proporcionar en cualquiera de una variedad de formas, por ejemplo, formas cristalinas, formas de sal, etc. En algunas realizaciones, los profármacos se proporcionan como sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

*Grupo protector:* El término "grupo protector", como se usa en el presente documento, se conoce bien en la técnica e incluye aquellos descritos en detalle en Protecting Groups in Organic Synthesis, T. W. Greene y P. G. M. Wuts, 3ª edición, John Wiley & Sons, 1999, cuya totalidad se incorpora en el presente documento como referencia. También se incluyen los grupos protectores especialmente adaptados para la química de nucleósidos y nucleótidos descrita en Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, editado por Serge L. Beaucage et al. 06/2012, cuya totalidad del Capítulo 2 se incorpora en el presente documento como referencia. Los grupos protectores de amino adecuados incluyen metilcarbamato, etilcarbamato, 9-fluorenilmetilcarbamato (Fmoc), 9-(2-sulfo)fluorenilmetilcarbamato, 9-(2,7-dibromo)fluorenilmetilcarbamato, 2,7-di-*t*-butil-[9-(10, 10-dioxo-10,10,10-tetrahidrotioxanthil)]metilcarbamato (DBD-Tmoc), 4-metoxifenacilcarbamato (Fenoc), 2,2,2-tricloroetilcarbamato (Troc), 2-trimetilsililetilcarbamato (Teoc), 2-feniletilcarbamato (hZ), 1-(1-adamantil)-1-metiletilcarbamato (Adpoc), 1,1-dimetil-2-haloetilcarbamato, 1,1-dimetil-2,2-dibromoetilcarbamato (DB-*t*-BOC), 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilcarbamato (TCBOC), 1-metil-1-(4-bifenilil)etilcarbamato (Bpoc), 1-(3,5-di-*t*-butilfenil)-1-metiletilcarbamato (*t*-Bumeoc), 2-(2'- y 4'-piridil)etilcarbamato (Pyoc), 2-(*N,N*-diciclohexilcarboxamido)etilcarbamato, *t*-butilcarbamato (BOC), 1-adamantilcarbamato (Adoc), vinilcarbamato (Voc), alilcarbamato (Alloc), 1-isopropilalilcarbamato (Ipaoc), cinamilcarbamato (Coc), 4-nitrocinaamilcarbamato (Noc), 8-quinolilcarbamato, *N*-hidroxipiperidinilcarbamato, alquilditiocarbamato, bencilcarbamato (Cbz), *p*-metoxibencilcarbamato (Moz), *p*-nitrobencilcarbamato, *p*-bromobencilcarbamato, *p*-clorobencilcarbamato, 2,4-diclorobencilcarbamato, 4-metilsulfonilbencilcarbamato (MsZ), 9-antrilmetilcarbamato, difenilmetilcarbamato, 2-metiltoetilcarbamato, 2-metilsulfoniletilcarbamato, 2-(*p*-toluenosulfonil)etilcarbamato, [2-(1,3-ditianil)]metilcarbamato (Dmoc), 4-metiltiofenilcarbamato (Mtpc), 2,4-dimetiltiofenilcarbamato (Bmpc), 2-fosfonioetilcarbamato (Peoc), 2-trifenilfosfonioisopropilcarbamato (Ppoc), 1,1-dimetil-2-cianoetilcarbamato, *m*-cloro-*p*-aciloxibencilcarbamato, *p*-(dihidroxiboril)bencilcarbamato, 5-bencisoxazolilmetilcarbamato, 2-(trifluorometil)-6-cromonilmetilcarbamato (Tcroc), *m*-nitrofenilcarbamato, 3,5-dimetoxibencilcarbamato, *o*-nitrobencilcarbamato, 3,4-dimetoxi-6-nitrobencilcarbamato, fenil(*o*-nitrofenil)metilcarbamato, derivado de fenotiazinil-(10)-carbonilo, derivado de *N-p*-toluenosulfonilaminocarbonilo, derivado de *N'*-fenilaminotiocarbonilo, *t*-amilcarbamato, *S*-benciltiocarbamato, *p*-cianobencilcarbamato, ciclobutilcarbamato, ciclohexilcarbamato, ciclopentilcarbamato, ciclopropilmetilcarbamato, *p*-deciloxibencilcarbamato, 2,2-dimetoxicarbonilvinilcarbamato, *o*-(*N,N*-dimetilcarboxamido)bencilcarbamato, 1,1-dimetil-3-(*N,N*-dimetilcarboxamido)propilcarbamato, 1,1-dimetilpropinilcarbamato, di(2-piridil)metilcarbamato, 2-furanilmetilcarbamato, 2-yodoetilcarbamato, isobornilcarbamato, isobutilcarbamato, isonicotinilcarbamato, *p*-(*p*-metoxifenilazo)bencilcarbamato, 1-metilciclobutilcarbamato, 1-metilciclohexilcarbamato, 1-metil-1-

ciclopropilmetilcarbamato, 1-metil-1-(3,5-dimetoxifenil)etilcarbamato, 1-metil-1-(*p*-fenilazofenil)etilcarbamato, 1-metil-1-feniletilcarbamato, 1-metil-1-(4-piridil)etilcarbamato, fenilcarbamato, *p*-(fenilazo)bencilcarbamato, 2,4,6-tri-*t*-butilfenilcarbamato, 4-(trimetilamonio)bencilcarbamato, 2,4,6-trimetilbencilcarbamato, formamida, acetamida, cloroacetamida, tricloroacetamida, trifluoroacetamida, fenilacetamida, 3-fenilpropanamida, picolinamida, 3-piridilcarboxamida, derivado de *N*-benzoilfenilalanilo, benzamida, *p*-fenilbenzamida, *o*-nitrofenilacetamida, *o*-nitrofenoxiacetamida, acetoacetamida, (*N*-ditiobenciloxycarbonilamino)acetamida, 3-(*p*-hidroxifenil)propanamida, 3-(*o*-nitrofenil)propanamida, 2-metil-2-(*o*-nitrofenoxi)propanamida, 2-metil-2-(*o*-fenilazofenoxi)propanamida, 4-clorobutanamida, 3-metil-3-nitrobutanamida, *o*-nitrocinamida, derivado de *N*-acetilmencionina, *o*-nitrobenzamida, *o*-(benzoiloximetil)benzamida, 4,5-difenil-3-oxazolin-2-ona, *N*-ftalimida, *N*-ditiassuccinimida (Dts), *N*-2,3-difenilmaleimida, *N*-2,5-dimetilpirrol, aducto de *N*-1,1,4,4-tetrametildisililazaciclopentano (STABASE), 1,3-dimetil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 1,3-dibencil-1,3,5-triazaciclohexan-2-ona 5-sustituida, 3,5-dinitro-4-piridona 1-sustituida, *N*-metilamina, *N*-alilamina, *N*-[2-(trimetilsilil)etoxi]metilamina (SEM), *N*-3-acetoxipropilamina, *N*-(1-isopropil-4-nitro-2-oxo-3-pirolin-3-il)amina, sales de amonio cuaternario, *N*-bencilamina, *N*-di(4-metoxifenil)metilamina, *N*-5-dibenzosuberilamina, *N*-trifenilmetilamina (Tr), *N*-[(4-metoxifenil)difenilmetil]amina (MMTr), *N*-9-fenilfluorenilamina (PhF), *N*-2,7-dicloro-9-fluorenilmetilamina, *N*-ferrocenilmetilamina (Fcm), *N*-óxido de *N*-2-picollilamina, *N*-1,1-dimetiltiometilamina, *N*-bencilidenamina, *N*-*p*-metoxibencilidenamina, *N*-difenilmetilamina, *N*-[(2-piridil)mesitil]metilamina, *N*-(*N,N*-dimetilaminometileno)amina, *N,N*-isopropilidendiamina, *N*-*p*-nitrobencilidenamina, *N*-salicilidenamina, *N*-5-clorosalicilidenamina, *N*-(5-cloro-2-hidroxifenil)fenilmetilamina, *N*-ciclohexilidenamina, *N*-(5,5-dimetil-3-oxo-1-ciclohexenil)amina, derivado de *N*-borano, derivado de ácido *N*-difenilborónico, *N*-[fenil(pentacarbonilcromo- o tungsteno)carbonil]amina, quelato de *N*-cobre, quelato de *N*-cinc, *N*-nitroamina, *N*-nitrosoamina, *N*-óxido de amina, difenilfosfinamida (Dpp), dimetiltiofosfinamida (Mpt), difeniltiofosfinamida (Ppt), dialquilfosforamidatos, dibencilfosforamidato, difenilfosforamidato, bencenosulfenamida, *o*-nitrobencenosulfenamida (Nps), 2,4-dinitrobencenosulfenamida, pentaclorobencenosulfenamida, 2-nitro-4-metoxibencenosulfenamida, trifenilmetilsulfenamida, 3-nitropiridinasulfenamida (Npys), *p*-toluenosulfenamida (Ts), bencenosulfenamida, 2,3,6-trimetil-4-metoxibencenosulfenamida (Mtr), 2,4,6-trimetoxibencenosulfenamida (Mtb), 2,6-dimetil-4-metoxibencenosulfenamida (Pme), 2,3,5,6-tetrametil-4-metoxibencenosulfenamida (Mte), 4-metoxibencenosulfenamida (Mbs), 2,4,6-trimetilbencenosulfenamida (Mts), 2,6-dimetoxi-4-metilbencenosulfenamida (iMds), 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfenamida (Pmc), metanosulfenamida (Ms),  $\beta$ -trimetilsililetanosulfenamida (SES), 9-antracenosulfenamida, 4-(4',8'-dimetoxinaftilmetil)bencenosulfenamida (DNMBS), bencilulfenamida, trifluorometilsulfenamida y fenacilsulfenamida.

Los ácidos carboxílicos adecuadamente protegidos adicionales incluyen, pero no se limitan a, ácidos carboxílicos protegidos con sililo, alquilo, alqueno, arilo y arilalquilo. Los ejemplos de grupos sililo adecuados incluyen trimetilsililo, trietilsililo, *t*-butildimetilsililo, *t*-butildifenilsililo, triisopropilsililo y similares. Los ejemplos de grupos alquilo adecuados incluyen metilo, bencilo, *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, tritilo, *t*-butilo, tetrahidropiran-2-ilo. Los ejemplos de grupos alqueno adecuados incluyen alilo. Los ejemplos de grupos arilo adecuados incluyen fenilo, bifenilo o naftilo opcionalmente sustituido. Los ejemplos de grupos arilalquilo adecuados incluyen bencilo opcionalmente sustituido (por ejemplo, *p*-metoxibencilo (MPM), 3,4-dimetoxibencilo, *O*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo) y 2- y 4-picolilo.

Los grupos protectores de hidroxilo adecuados incluyen metilo, metoximetilo (MOM), metiltiometilo (MTM), *t*-butiltiometilo, (fenildimetilsilil)metoximetilo (SMOM), benciloximetilo (BOM), *p*-metoxibenciloximetilo (PMBM), (4-metoxifenoxi)metilo (*p*-AOM), guaiacolmetilo (GUM), *t*-butoximetilo, 4-penteniloximetilo (POM), siloximetilo, 2-metoxietoximetilo (MEM), 2,2,2-tricloroetoximetilo, bis(2-cloroetoxi)metilo, 2-(trimetilsilil)etoximetilo (SEMOR), tetrahidropirano (THP), 3-bromotetrahidropirano, tetrahidrotiopirano, 1-metoxiciclohexilo, 4-metoxitetrahidropirano (MTHP), 4-metoxitetrahidrotiopirano, S,S-dióxido de 4-metoxitetrahidrotiopirano, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (CTMP), 1,4-dioxan-2-ilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidrotiofuranilo, 2,3,3a,4,5,6,7,7a-octahidro-7,8,8-trimetil-4,7-metanobenzofuran-2-ilo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 1-metil-1-metoxietilo, 1-metil-1-benciloxietilo, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetilo, 2,2,2-tricloroetilo, 2-trimetilsililetilo, 2-(fenilselenil)etilo, *t*-butilo, alilo, *p*-clorofenilo, *p*-metoxifenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, *p*-metoxibencilo, 3,4-dimetoxibencilo, *o*-nitrobencilo, *p*-nitrobencilo, *p*-halobencilo, 2,6-diclorobencilo, *p*-cianobencilo, *p*-fenilbencilo, 2-picolilo, 4-picolilo, *N*-óxido de 3-metil-2-picolilo, difenilmetilo, *p,p'*-dinitrobenzidrido, 5-dibenzosuberilo, trifenilmetilo,  $\alpha$ -naftildifenilmetilo, *p*-metoxifenildifenilmetilo, di(*p*-metoxifenil)fenilmetilo, tri(*p*-metoxifenil)metilo, 4-(4'-bromofenaciloxifenil)difenilmetilo, 4,4',4"-tris(4,5-dicloroftalimidofenil)metilo, 4,4',4"-tris(levulinoiloxifenil)metilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxifenil)metilo, 3-(imidazol-1-il)bis(4',4"-dimetoxifenil)metilo, 1,1-bis(4-metoxifenil)-1'-pirenilmetilo, 9-antrilo, 9-(9-fenil)xantenilo, 9-(9-fenil-10-oxo)antrilo, 1,3-benzoditiolan-2-ilo, S,S-dioxido de bencisotiazolilo, trimetilsililo (TMS), trietilsililo (TES), triisopropilsililo (TIPS), dimetilisopropilsililo (IPDMS), dietilisopropilsililo (DEIPS), dimetilhexilsililo, *t*-butildimetilsililo (TBDMS), *t*-butildifenilsililo (TBDPS), tribencilsililo, tri-*p*-xililsililo, trifenilsililo, difenilmetilsililo (DPMS), *t*-butilmtoxifenilsililo (TBMPS), formiato, benzoilformiato, acetato, cloroacetato, dicloroacetato, tricloroacetato, trifluoroacetato, metoxiacetato, trifenilmetoxiacetato, fenoxiacetato, *p*-clorofenoxiacetato, 3-fenilpropionato, 4-oxopentanoato (levulinato), 4,4-(etilenoditio)pentanoato (levulinoilditioacetal), pivaloato, adamantato, crotonato, 4-metoxicrotonato, benzoato, *p*-fenilbenzoato, 2,4,6-trimetilbenzoato (mesitoato), carbonato de alquilmetilo, 9-fluorenilmetilcarbonato (Fmoc), carbonato de alquiletilo, carbonato de alquil-2,2,2-tricloroetilo (Troc), 2-(trimetilsilil)etilcarbonato (TMSEC), 2-(fenilsulfonil)etilcarbonato (Psec), 2-(trifenilfosfonio)etilcarbonato (Peoc), alquilisobutilcarbonato, alquilvinilcarbonato alquilalilcarbonato, alquil-*p*-nitrofenilcarbonato, alquilbencilcarbonato, alquil-*p*-metoxibencilcarbonato, alquil-3,4-dimetoxibencilcarbonato, alquil-*o*-nitrobencilcarbonato, alquil-*p*-nitrobencilcarbonato, alquil-*S*-benciltiocarbonato, 4-

5 etoxi-1-naftilcarbonato, metilditiocarbonato, 2-yodobenzoato, 4-azidobutirato, 4-nitro-4-metilpentanoato, o-(dibromometil)benzoato, 2-formilbencenosulfonato, 2-(metiltiometoxi)etilo, 4-(metiltiometoxi)butirato, 2-(metiltiometoximetil)benzoato, 2,6-dicloro-4-metilfenoxiacetato, 2,6-dicloro-4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenoxiacetato, 2,4-bis(1,1-dimetilpropil)fenoxiacetato, clorodifenilacetato, isobutirato, monosuccinato, (E)-2-metil-2-butenato, o-(metoxicarbonil)benzoato,  $\alpha$ -naftoato, nitrato, N,N,N,N-tetrametilfosforodiamidato de alquilo, N-fenilcarbamato de alquilo, borato, dimetilfosfinotioilo, 2,4-dinitrofenilsulfonato de alquilo, sulfato, metanosulfonato (mesilato), bencilsulfonato y tosilato (Ts). Para proteger 1,2- o 1,3-dioles, los grupos protectores incluyen metilenacetal, etilidenacetal, 1-t-butiletalidencetal, 1-feniletalidencetal, (4-metoxifenil)etilidenacetal, 2,2,2-tricloroetilidenacetal, acetónido, ciclopentilidencetal, ciclohexilidencetal, cicloheptilidencetal, bencilidenacetal, p-metoxibencilidenacetal, 2,4-dimetoxibencilidenacetal, 3,4-dimetoxibencilidenacetal, 2-nitrobencilidenacetal, metoximetilenacetal, etoximetilenacetal, orto-éster de dimetoximetileno, orto-éster de 1-metoxietilideno, orto-éster de 1-etoxietilidina, orto-éster de 1,2-dimetoxietilideno, orto-éster de  $\alpha$ -metoxibencilideno, derivado de 1-(N,N-dimetilamino)etilideno, derivado de  $\alpha$ -(N,N-dimetilamino)bencilideno, orto-éster de 2-oxaciclopentilideno, grupo di-t-butilsilileno (DTBS), derivado de 1,3-(1,1,3,3-tetraisopropildisiloxanilideno) (TIPDS), derivado de tetra-t-butoxididisiloxano-1,3-diilideno (TBDS), 15 carbonatos cíclicos, boronatos cíclicos, etilboronato y fenilboronato.

En algunas realizaciones, un grupo protector de hidroxilo es acetilo, t-butilo, t-butoximetilo, metoximetilo, tetrahidropiraniolo, 1-etoxietilo, 1-(2-cloroetoxi)etilo, 2-trimetilsililetilo, p-clorofenilo, 2,4-dinitrofenilo, bencilo, benzoílo, p-fenilbenzoílo, 2,6-diclorobencilo, difenilmetilo, p-nitrobencilo, trifenilmetilo (tritrilo), 4,4'-dimetoxitritilo, trimetilsililo, trietilsililo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo, trifenilsililo, triisopropilsililo, benzoilformiato, cloroacetilo, tricloroacetilo, trifluoroacetilo, pivaloílo, 9-fluorenilmetilcarbonato, mesilato, tosilato, triflato, tritrilo, monometoxitritilo (MMTr), 4,4'-dimetoxitritilo, (DMTr) y 4,4',4"-trimetoxitritilo (TMTr), 2-cianoetilo (CE o Cne), 2-(trimetilsilil)etilo (TSE), 2-(2-nitrofenil)etilo, 2-(4-cianofenil)etil 2-(4-nitrofenil)etilo (NPE), 2-(4-nitrofenilsulfonil)etilo, 3,5-diclorofenilo, 2,4-dimetilfenilo, 2-nitrofenilo, 4-nitrofenilo, 2,4,6-trimetilfenilo, 2-(2-nitrofenil)etilo, butiltiocarbonilo, 4,4',4"-tris(benzoiloxi)tritrilo, difenilcarbamoílo, levulinilo, 2-(dibromometil)benzoílo (Dbmb), 2-(isopropiltiometoximetil)benzoílo (Ptmt), 9-fenilxanten-9-ilo (Pixyl) o 9-(p-metoxifenil)xantina-9-ilo (MOX). En algunas realizaciones, cada uno de los grupos protectores de hidroxilo se selecciona independientemente de acetilo, bencilo, t-butildimetilsililo, t-butildifenilsililo y 4,4'-dimetoxitritilo. En algunas realizaciones, el grupo protector de hidroxilo se selecciona del grupo que consiste en grupo tritrilo, monometoxitritilo y 4,4'-dimetoxitritilo.

En algunas realizaciones, un grupo protector de fósforo es un grupo unido al enlace internucleotídico de fósforo durante toda la síntesis de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, el grupo protector de fósforo se une al átomo de azufre del enlace internucleotídico fosforotioato. En algunas realizaciones, el grupo protector de fósforo se une al átomo de oxígeno del enlace internucleotídico fosforotioato. En algunas realizaciones, el grupo protector de fósforo se une al átomo de oxígeno del enlace fosfato internucleotídico. En algunas realizaciones, el grupo protector de fósforo es 2-cianoetilo (CE o Cne), 2-trimetilsililetilo, 2-nitroetilo, 2-sulfonietilo, metilo, bencilo, o-nitrobencilo, 2-(p-nitrofenil)etilo (NPE o Npe), 2-feniletilo, 3-(N-terc-butilcarboxamido)-1-propilo, 4-oxopentilo, 4-metiltio-1-butilo, 2-ciano-1,1-dimetiletilo, 4-N-metilaminobutilo, 3-(2-piridil)-1-propilo, 2-[N-metil-N-(2-piridil)]aminoetilo, 2-(N-formilo,N-metil)aminoetilo, 4-[N-metil-N-(2,2,2-trifluoroacetil)amino]butilo.

*Proteína:* Como se usa en el presente documento, el término "proteína" se refiere a un polipéptido (es decir, una tira de al menos dos aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos). En algunas realizaciones, las proteínas incluyen solo aminoácidos naturales. En algunas realizaciones, las proteínas incluyen uno o más aminoácidos que no existen de forma natural (por ejemplo, restos que forman uno o más enlaces peptídicos con aminoácidos adyacentes). En algunas realizaciones, uno o más restos en una cadena de proteína contienen un resto no de aminoácido (por ejemplo, un glicano, etc.). En algunas realizaciones, una proteína incluye más de una cadena de polipéptidos, por ejemplo unida por uno o más enlaces disulfuro o asociada por otros medios. En algunas realizaciones, las proteínas contienen L-aminoácidos, D-aminoácidos, o ambos; en algunas realizaciones, las proteínas contienen una o más modificaciones de aminoácidos o análogos conocidos en la técnica. Las modificaciones útiles incluyen, por ejemplo, acetilación terminal, amidación, metilación, etc. El término "péptido" se usa, en general, para referirse a un polipéptido que tiene una longitud de menos de aproximadamente 100 aminoácidos, menos de aproximadamente 50 aminoácidos, menos de 20 aminoácidos, o menos de 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, las proteínas son anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, porciones biológicamente activas de los mismos, y/o porciones características de los mismos.

*Muestra:* Una "muestra", como se usa en el presente documento, es un organismo específico o material obtenido del mismo. En algunas realizaciones, una muestra es una muestra biológica obtenida o derivada de una fuente de interés, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, una fuente de interés comprende un organismo, tal como un animal o humano. En algunas realizaciones, una muestra biológica comprende tejido o líquido biológico. En algunas realizaciones, una muestra biológica es o comprende médula ósea; sangre; glóbulos sanguíneos; ascitis; muestras de biopsia de tejido o con aguja fina; líquidos corporales que contienen células; ácidos nucleicos de flotación libre; esputo; saliva; orina; líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal; líquido pleural; heces; linfa; líquidos ginecológicos; hisopos cutáneos; frotis vaginales; hisopos orales; hisopos nasales; enjuagues o lavados, tales como lavados ductales o lavados broncoalveolares; aspirados; raspados; especímenes de médula ósea; biopsia de especímenes de tejido; especímenes quirúrgicos; heces, otros líquidos corporales, secreciones y/o excreciones; y/o células de los mismos, etc. En algunas realizaciones, una muestra biológica es o comprende células obtenidas de un individuo. En algunas realizaciones, una muestra es una "muestra primaria" obtenida directamente de una fuente de



interés por cualquier medio apropiado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una muestra biológica primaria se obtiene por métodos seleccionados del grupo que consiste en biopsia (por ejemplo, aspiración con aguja fina o biopsia de tejido), cirugía, recogida de líquido corporal (por ejemplo, sangre, linfa, heces, etc.), etc. En algunas realizaciones, como será evidente del contexto, el término "muestra" se refiere a una preparación que se obtiene por procesamiento (por ejemplo, retirando uno o más componentes de y/o añadiendo uno o más agentes a) de una muestra primaria. Por ejemplo, el filtrado usando una membrana semipermeable. Dicha "muestra procesada" puede comprender, por ejemplo, ácidos nucleicos o proteínas extraídas de una muestra u obtenidas sometiendo una muestra primaria a técnicas tales como amplificación o transcripción inversa de ARNm, aislamiento y/o purificación de ciertos componentes, etc. En algunas realizaciones, una muestra es un organismo. En algunas realizaciones, una muestra es una planta. En algunas realizaciones, una muestra es un animal. En algunas realizaciones, una muestra es un ser humano. En algunas realizaciones, una muestra es un organismo distinto de un ser humano.

*Formas estereoquímicamente isoméricas:* La expresión "formas estereoquímicamente isoméricas", como se usa en el presente documento, se refiere a diferentes compuestos constituidos por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces, pero que tienen diferentes estructuras tridimensionales que no son intercambiables. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones químicas proporcionadas pueden ser o incluir preparaciones puras de formas estereoquímicamente isoméricas individuales de un compuesto; en algunas realizaciones, las composiciones químicas proporcionadas pueden ser o incluir mezclas de dos o más formas estereoquímicamente isoméricas del compuesto. En ciertas realizaciones, dichas mezclas contienen cantidades iguales de diferentes formas estereoquímicamente isoméricas; en ciertas realizaciones, dichas mezclas contienen diferentes cantidades de al menos dos formas estereoquímicamente isoméricas diferentes. En algunas realizaciones, una composición química puede contener todos los diaestereómeros y/o enantiómeros del compuesto. En algunas realizaciones, una composición química puede contener menos de todos los diaestereómeros y/o enantiómeros de un compuesto. En algunas realizaciones, si se desea un enantiómero particular de un compuesto de la presente invención, se puede preparar, por ejemplo, por síntesis asimétrica, o por derivación con un auxiliar quiral, donde la mezcla diaestereomérica resultante se separa y se escinde del grupo auxiliar para proporcionar los enantiómeros deseados puros. Alternativamente, donde la molécula contenga un grupo funcional básico, tal como amino, se forman sales diaestereomérica con un ácido ópticamente activo apropiado, y se resuelven, por ejemplo, mediante cristalización fraccionada.

*Sujeto:* Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" o "sujeto de prueba" se refiere a cualquier organismo al que se administra un compuesto proporcionado o composición según la presente invención, por ejemplo, para fines experimentales, de diagnóstico, profilácticos y/o terapéuticos. Los sujetos típicos incluyen animales (por ejemplo, mamíferos, tales como ratones, ratas, conejos, primates no humanos y seres humanos; insectos; gusanos; etc.) y plantas. En algunas realizaciones, un sujeto pueden padecer, y/o ser susceptible, a una enfermedad, trastorno y/o afección.

*Sustancialmente:* Como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" se refiere a la afección cualitativa de presentar una extensión o grado total o casi total de una característica o propiedad de interés. Un experto en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, si alguna vez, llegan a completarse y/o proceden a la exhaustividad o logran o evitan un resultado absoluto. El término "sustancialmente" se usa, por tanto, en el presente documento para capturar la posible ausencia de exhaustividad inherente en muchos fenómenos biológicos y/o químicos.

*Que padece:* Un individuo "que padece" una enfermedad, trastorno y/o afección ha sido diagnosticado con y/o muestra uno o más síntomas de una enfermedad, trastorno y/o afección.

*Susceptible a:* Un individuo que es "susceptible a" una enfermedad, trastorno y/o afección es uno que tiene un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad, trastorno y/o afección que un miembro del público general. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección puede no haber sido diagnosticado con la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno, y/o afección puede presentar síntomas de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección puede no presentar síntomas de la enfermedad, trastorno, y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, un individuo que es susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección no desarrollará la enfermedad, trastorno y/o afección.

*Sistémico:* Las expresiones "administración sistémica", "administrado por vía sistémica", "administración periférica" y "administrado periféricamente", como se usa en el presente documento, tienen su significado entendido en la técnica con referencia a la administración de un compuesto o composición de forma que entre en el sistema del receptor.

*Formas tautómeras:* La expresión "formas tautómeras", como se usa en el presente documento, se usa para describir diferentes formas isoméricas de compuestos orgánicos que son capaces de una simple interconversión. Los tautómeros se pueden caracterizar por la migración formal de un átomo de hidrógeno o protón, acompañada por un cambio de un enlace sencillo y doble enlace adyacente. En algunas realizaciones, los tautómeros pueden resultar de

tautomería prototrópica (es decir, la relocalización de un protón). En algunas realizaciones, los tautómeros pueden resultar de tautomería de valencia (es decir, la rápida reorganización de electrones de enlace). Todas esas formas tautómeras pretenden estar incluidas dentro del alcance de la presente invención. En algunas realizaciones, las formas tautómeras de un compuesto existen en equilibrio móvil entre sí, de manera que los intentos por preparar las sustancias separadas dan como resultado la formación de una mezcla. En algunas realizaciones, las formas tautómeras de un compuesto son compuestos separables y aislables. En algunas realizaciones de la invención, se pueden proporcionar composiciones químicas que son o incluyen preparaciones puras de una única forma tautómera de un compuesto. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones químicas se pueden proporcionar como mezclas de dos o más formas tautómeras de un compuesto. En ciertas realizaciones, dichas mezclas contienen cantidades iguales de diferentes formas tautómeras; en ciertas realizaciones, dichas mezclas contienen diferentes cantidades de al menos dos formas tautómeras diferentes de un compuesto. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones químicas pueden contener todas las formas tautómeras de un compuesto. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones químicas pueden contener menos de todas las formas tautómeras de un compuesto. En algunas realizaciones de la invención, las composiciones químicas pueden contener una o más formas tautómeras de un compuesto en cantidades que varían con el tiempo como resultado de la interconversión. En algunas realizaciones de la invención, la tautomería es tautomería ceto-enol. Un experto en las técnicas químicas reconocería que un tautómero ceto-enol puede quedar "atrapado" (es decir, químicamente modificado de forma que quede en la forma "enol") usando cualquier reactivo adecuado conocido en las técnicas químicas para proporcionar un derivado de enol que se puede aislar posteriormente usando una o más técnicas adecuadas conocidas en la técnica. A menos que se indique lo contrario, la presente invención engloba todas las formas tautómeras de los compuestos relevantes, tanto en forma pura como en mezcla entre sí.

*Agente terapéutico:* Como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a cualquier agente que, cuando se administra a un sujeto, tiene un efecto terapéutico y/o provoca un efecto biológico y/o farmacológico deseado. En algunas realizaciones, un agente terapéutico es cualquier sustancia que se puede usar para aliviar, mejorar, remediar, inhibir, prevenir, retrasar la aparición de, reducir la intensidad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección.

*Cantidad terapéuticamente eficaz:* Como se usa en el presente documento, el término "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad de una sustancia (por ejemplo, un agente terapéutico, composición y/o formulación) que provoca una respuesta biológica deseada cuando se administra como parte de una pauta terapéutica. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de una sustancia es una cantidad que es suficiente, cuando se administra a un sujeto que padece o susceptible a una enfermedad, trastorno y/o afección, para tratar, diagnosticar, prevenir y/o retrasar la aparición de la enfermedad, trastorno y/o afección. Como será apreciado por aquellos expertos habituales en esta técnica, la cantidad eficaz de una sustancia puede variar dependiendo de factores tales como el criterio de valoración biológico deseado, la sustancia a administrar, la célula o el tejido diana, etc. Por ejemplo, la cantidad eficaz de un compuesto en una formulación para tratar una enfermedad, trastorno y/o afección es la cantidad que alivia, mejora, remedia, inhibe, previene, retrasa la aparición de, reduce la intensidad de y/o reduce la incidencia de uno o más síntomas o características de la enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz se administra en una dosis única; en algunas realizaciones, se requieren múltiples dosis unitarias para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz.

*Tratar:* Como se usa en el presente documento, el término "tratar", "tratamiento" o "que trata" se refiere a cualquier método usado para aliviar parcial o completamente, mejorar, remediar, inhibir, prevenir, retrasar la aparición de, reducir la intensidad de y/o reducir la incidencia de uno o más síntomas o características de una enfermedad, trastorno y/o afección. El tratamiento se puede administrar a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad, trastorno y/o afección. En algunas realizaciones, el tratamiento se puede administrar a un sujeto que presenta solo los primeros signos de la enfermedad, trastorno y/o afección, por ejemplo, con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología asociada con la enfermedad, trastorno y/o afección.

*Insaturado:* El término "insaturado", como se usa en el presente documento, significa que un resto tiene una o más unidades de insaturación.

*Dosis unitaria:* La expresión "dosis unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad administrada como una dosis única y/o en una unidad físicamente discreta de una composición farmacéutica. En muchas realizaciones, una dosis unitaria contiene una cantidad predeterminada de un agente activo. En algunas realizaciones, una dosis unitaria contiene una dosis única completa del agente. En algunas realizaciones, se administra más de una dosis unitaria para lograr una dosis única total. En algunas realizaciones, se requiere la administración de múltiples dosis unitarias, o se espera que se requiera, para lograr un efecto previsto. Una dosis unitaria puede ser, por ejemplo, un volumen de líquido (por ejemplo, un vehículo aceptable) que contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos, una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos en forma sólida, una formulación de liberación sostenida, o dispositivo de administración de fármaco que contiene una cantidad predeterminada de uno o más agentes terapéuticos, etc. Se apreciará que una dosis unitaria puede estar presente en una formulación que incluye cualquiera de una variedad de componentes, además del (de los) agente(s) terapéutico(s). Por ejemplo, se pueden incluir vehículos aceptables (por ejemplo, vehículos farmacéuticamente aceptables), diluyentes, estabilizadores, tampones, conservantes, etc., como se describe más adelante. Se apreciará por los

expertos en la técnica, en muchas realizaciones, que una dosis diaria apropiada total de un agente terapéutico particular puede comprender una porción, o una pluralidad, de dosis unitarias, y puede ser decidida, por ejemplo, por el médico adjunto dentro del alcance del criterio médico sensato. En algunas realizaciones, el nivel de dosis eficaz específica para cualquier sujeto particular u organismo puede depender de una variedad de factores que incluyen el trastorno que está tratándose y la intensidad del trastorno; la actividad del compuesto activo específico empleado; la composición específica empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del sujeto; el tiempo de administración y la velocidad de eliminación del compuesto activo específico empleado; la duración del tratamiento; los fármacos y/o terapias adicionales usados en combinación o coincidentes con el (los) compuesto(s) específico(s) empleado(s), y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

*Natural:* Como se usa en el presente documento, el término "natural" tiene su significado entendido en la técnica, que se refiere a una entidad que tiene una estructura y/o actividad como se encuentra en la naturaleza en un estado o contexto "normal" (en contraste con mutante, enfermo, alterado, etc.). Los expertos habituales en la técnica apreciarán que los genes y polipéptidos naturales existen frecuentemente en múltiples formas diferentes (por ejemplo, alelos).

*Ácido nucleico:* El término "ácido nucleico" incluye cualquier nucleótido, análogos de los mismos y polímeros de los mismos. El término "polinucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea ribonucleótidos (ARN) o desoxirribonucleótidos (ADN). Estos términos se refieren a la estructura primaria de las moléculas y, por lo tanto, incluyen ADN bi- y monocatenario, y ARN bi- y monocatenario. Estos términos incluyen, como equivalentes, análogos de cualquiera de ARN o ADN preparados a partir de análogos de nucleótidos y polinucleótidos modificados, tales como, aunque no se limitan a, nucleótidos o polinucleótidos metilados, protegidos y/o tapados. Los términos engloban poli- u oligo-ribonucleótidos (ARN) y poli- u oligo-desoxirribonucleótidos (ADN); ARN o ADN derivado de N-glucósidos o C-glucósidos de nucleobases y/o nucleobases modificadas; ácidos nucleicos derivados de azúcares y/o azúcares modificados; y ácidos nucleicos derivados de puentes de fosfato y/o puentes de átomos de fósforo modificados (también denominados en el presente documento "enlaces internucleotídicos"). El término engloba ácidos nucleicos que contienen cualquier combinación de nucleobases, nucleobases modificadas, azúcares, azúcares modificados, puentes de fosfato o puentes de átomos de fósforo modificados. Los ejemplos incluyen, y no se limitan a, ácidos nucleicos que contienen restos de ribosa, los ácidos nucleicos que contienen restos de desoxi-ribosa, ácidos nucleicos que contienen tanto restos de ribosa como de desoxirribosa, ácidos nucleicos que contienen restos de ribosa y ribosa modificada. El prefijo poli- se refiere a un ácido nucleico que contiene 2 a aproximadamente 10.000 unidades de monómeros de nucleótidos y en donde el prefijo oligo- se refiere a un ácido nucleico que contiene 2 a aproximadamente 200 unidades de monómeros de nucleótidos.

*Nucleótido:* El término "nucleótido", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad monomérica de un polinucleótido que consiste en una base heterocíclica, un azúcar y uno o más grupos fosfato o enlaces internucleotídicos que contienen fósforo. La bases naturales (guanina (G), adenina (A), citosina (C), timina (T) y uracilo (U)) son derivados de purina o pirimidina, aunque se debe entender que también están incluidos análogos de bases naturales y que no existen de forma natural. El azúcar natural es la desoxirribosa pentosa (azúcar de cinco carbonos) (que forma ADN) o ribosa (que forma ARN), aunque se debe entender que también están incluidos análogos de azúcares naturales y que no existen de forma natural. Los nucleótidos se unen por enlaces internucleotídicos para formar ácidos nucleicos, o polinucleótidos. Se conocen en la técnica muchos enlaces internucleotídicos (tales como, aunque no se limita a, fosfato, fosforotioatos, boranofosfatos y similares). Los ácidos nucleicos artificiales incluyen PNA (ácidos nucleicos peptídicos), fosfotriésteres, fosforotionatos, *H*-fosfonatos, fosforamidatos, boranofosfatos, metilfosfonatos, fosfonoacetatos, tiofosfonoacetatos y otras variantes del esqueleto de fosfato de ácidos nucleicos nativos, tales como los descritos en el presente documento.

*Nucleósido:* El término "nucleósido" se refiere a un resto en donde una nucleobase o una nucleobase modificada se une covalentemente a un azúcar o azúcar modificado.

*Azúcar:* El término "azúcar" se refiere a un monosacárido en forma cerrada y/u abierta. Los azúcares incluyen, pero no se limitan a, restos de ribosa, desoxirribosa, pentofuranosa, pentopiranososa y hexopiranososa. Como se usa en el presente documento, el término también engloba análogos estructurales usados en lugar de moléculas de azúcar convencional, tales como glicol, cuyo polímero forma el esqueleto del análogo de ácido nucleico, el ácido nucleico de glicol ("GNA").

*Azúcar modificado:* El término "azúcar modificado" se refiere a un resto que puede sustituir a un azúcar. El azúcar modificado imita la disposición espacial, las propiedades electrónicas, o alguna otra propiedad fisicoquímica de un azúcar.

*Nucleobase:* El término "nucleobase" se refiere a las partes de los ácidos nucleicos que participan en la unión al hidrógeno que une una cadena de ácido nucleico con otra cadena complementaria en un modo específico de secuencia. Las nucleobases naturales más comunes son adenina (A), guanina (G), uracilo (U), citosina (C) y timina (T). En algunas realizaciones, las nucleobases naturales son adenina, guanina, uracilo, citosina o timina modificado. En algunas realizaciones, las nucleobases naturales son adenina, guanina, uracilo, citosina o timina metilado. En algunas realizaciones, una nucleobase es una "nucleobase modificada", por ejemplo, una nucleobase distinta de adenina (A), guanina (G), uracilo (U), citosina (C) y timina (T). En algunas realizaciones, las nucleobases modificadas

son adenina, guanina, uracilo, citosina o timina metilados. En algunas realizaciones, la nucleobase modificada imita la disposición espacial, las propiedades electrónicas, o alguna otra propiedad fisicoquímica de la nucleobase y retiene la propiedad de unión al hidrógeno que une una cadena de ácido nucleico con otra en un modo específico de secuencia. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada puede emparejarse con todas las cinco bases naturales (uracilo, timina, adenina, citosina o guanina) sin afectar sustancialmente el comportamiento de fusión, el reconocimiento por enzimas intracelulares o la actividad del dúplex de oligonucleótido.

*Ligando quirral:* El término "ligando quirral" o "auxiliar quirral" se refiere a un resto que es quirral y se puede incorporar en una reacción de manera que la reacción se pueda llevar a cabo con cierta estereoselectividad.

*Reactivo de condensación:* En una reacción de condensación, el término "reactivo de condensación" se refiere a un reactivo que activa un sitio menos reactivo y hace que sea más susceptible al ataque por otro reactivo. En algunas realizaciones, dicho otro reactivo es un nucleófilo.

*Grupo de bloqueo:* El término "grupo de bloqueo" se refiere a un grupo que enmascara la reactividad de un grupo funcional. El grupo funcional puede ser posteriormente desenmascarado por retirada del grupo de bloqueo. En algunas realizaciones, un grupo de bloqueo es un grupo protector.

*Resto:* El término "resto" se refiere a un segmento o grupo funcional específico de una molécula. Los restos químicos son entidades químicas frecuentemente reconocidas incorporadas o unidas a una molécula.

*Soporte sólido:* El término "soporte sólido" se refiere a cualquier soporte que permita la síntesis de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, el término se refiere a un vidrio o a un polímero, que es insoluble en el medio empleado en las etapas de reacción realizadas para sintetizar los ácidos nucleicos, y se derivatiza para comprender grupos reactivos. En algunas realizaciones, el soporte sólido es poliestireno altamente reticulado (HCP) o vidrio de poro controlado (CPG). En algunas realizaciones, el soporte sólido es vidrio de poro controlado (CPG). En algunas realizaciones, el soporte sólido es un soporte híbrido de vidrio de poro controlado (CPG) y poliestireno altamente reticulado (HCP).

*Resto de unión:* El término "resto de unión" se refiere a cualquier resto opcionalmente situado entre el nucleósido terminal y el sólido soporte o entre el nucleósido terminal y otro nucleósido, nucleótido o ácido nucleico.

*Molécula de ADN:* Una "molécula de ADN" se refiere a la forma polimérica de desoxirribonucleótidos (adenina, guanina, timina o citosina) en o su forma monocatenaria o una hélice bicatenaria. Este término se refiere solo a la estructura primaria y secundaria de la molécula, y no se limita a ninguna forma terciaria particular. Por lo tanto, este término incluye ADN bicatenario encontrado, entre otras cosas, en moléculas de ADN lineal (por ejemplo, fragmentos de restricción), virus, plásmidos y cromosomas. En el tratamiento de la estructura de moléculas de ADN bicatenario particulares, se pueden describir secuencias en el presente documento según la convención normal de dar solo la secuencia en la dirección de 5' a 3' a lo largo de la cadena no transcrita de ADN (es decir, la cadena que tiene una secuencia homóloga al ARNm).

*Secuencia codificante:* Una "secuencia codificante" o "región codificante" de ADN es una secuencia de ADN bicatenario que se transcribe y traduce en un polipéptido *in vivo* cuando se pone bajo el control de secuencias de control de la expresión apropiadas. Los límites de la secuencia codificante (el "marco de lectura abierto" o "ORF") se determinan por un codón de iniciación en el extremo 5' (amino) y un codón de terminación de la traducción en el extremo 3' (carboxilo). Una secuencia codificante puede incluir, pero no se limita a, secuencias procariotas, ADNc de ARNm eucariota, secuencias de ADN genómico de ADN eucariota (por ejemplo, de mamífero) y secuencias de ADN sintético. Una señal de poliadenilación y secuencia de terminación de la transcripción se localiza, normalmente, 3' con respecto a la secuencia codificante. El término "secuencia no codificante" o "región no codificante" se refiere a regiones de una secuencia de polinucleótidos que no se traducen en aminoácidos (por ejemplo, regiones no traducidas 5' y 3').

*Marco de lectura:* El término "marco de lectura" se refiere a uno de los seis posibles marcos de lectura, tres en cada dirección, de la molécula de ADN bicatenario. El marco de lectura que se usa determina qué codones se usan para codificar los aminoácidos dentro de la secuencia codificante de una molécula de ADN.

*Antisentido:* Como se usa en el presente documento, una molécula de ácido nucleico "antisentido" comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria a un ácido nucleico "sentido" que codifica una proteína, por ejemplo, complementaria a la cadena codificante de una molécula de ADNc bicatenario, complementaria a una secuencia de ARNm o complementaria a la cadena codificante de un gen. Por consiguiente, una molécula de ácido nucleico antisentido se puede asociar por enlaces de hidrógeno con una molécula de ácido nucleico sentido.

*Posición de titubeo:* Como se usa en el presente documento, una "posición de titubeo" se refiere a la tercera posición de un codón. Las mutaciones en una molécula de ADN dentro de la posición de titubeo de un codón, en algunas realizaciones, dan como resultado mutaciones silenciosas o conservativas al nivel de aminoácido. Por ejemplo, hay cuatro codones que codifican glicina, es decir, GGU, GGC, GGA y GGG, así la mutación de cualquier nucleótido en la posición de titubeo, con respecto a cualquier otro nucleótido seleccionado de A, U, C y G, no produce un cambio al nivel de aminoácido de la proteína codificada y, por lo tanto, es una sustitución silenciosa.

*Sustitución silenciosa:* Una "sustitución silenciosa" o "mutación silenciosa" es una en la que un nucleótido dentro de un codón se modifica, pero no produce un cambio en el resto de aminoácido codificado por el codón. Los ejemplos incluyen mutaciones en la tercera posición de un codón, además de en la primera posición de ciertos codones, tales como en el codón "CGG" que, cuando se muta a AGG, todavía codifica Arg.

*Gen:* Los términos "gen", "gen recombinante" y "construcción génica", como se usan en el presente documento, se refieren a una molécula de ADN, o porción de una molécula de ADN, que codifica una proteína o una porción de la misma. La molécula de ADN puede contener un marco de lectura abierto que codifica la proteína (como secuencias de exón) y puede incluir además secuencias de intrón. El término "intrón", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de ADN presente en un gen dado que no se traduce en proteína y se encuentra en algunos, pero no todos los casos, entre los exones. Puede ser conveniente que el gen esté unido operativamente a (o pueda comprender), uno o más promotores, potenciadores, represores y/u otras secuencias reguladoras para modular la actividad o expresión del gen, como se conoce bien en la técnica.

*ADN complementario:* Como se usa en el presente documento, un "ADN complementario" o "ADNc" incluye polinucleótidos recombinantes sintetizados por retrotranscripción de ARNm y de los que se han eliminado secuencias intercaladas (intrones).

*Homología:* "Homología" o "identidad" o "similitud" se refiere a la similitud de secuencias entre dos moléculas de ácidos nucleicos. La homología e identidad se pueden determinar cada una comparando una posición en cada secuencia que se puede alinear para los fines de comparación. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por el mismo resto de ácido nucleico o uno similar (por ejemplo, similar en naturaleza estérica y/o electrónica), entonces las moléculas se pueden denominar homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología/similitud o identidad se refiere a una función del número de ácidos nucleicos idénticos o similares en las posiciones compartidas por las secuencias comparadas. Una secuencia que está "sin relacionar" o es "no homóloga" comparte menos del 40 % de identidad, menos del 35 % de identidad, menos del 30 % de identidad, o menos del 25 % de identidad con una secuencia descrita en el presente documento. En la comparación de dos secuencias, la ausencia de restos (aminoácidos o ácidos nucleicos) o la presencia de restos adicionales también disminuye la identidad y homología/similitud.

En algunas realizaciones, el término "homología" describe una comparación matemáticamente basada de similitudes de secuencias que se usa para identificar genes con funciones o motivos similares. Las secuencias de ácidos nucleicos descritas en el presente documento se pueden usar como una "secuencia problema" para realizar una búsqueda por comparación con bases de datos públicas, por ejemplo, para identificar otros miembros de la familia, secuencias u homólogos relacionados. En algunas realizaciones, dichas búsquedas se pueden realizar usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. En algunas realizaciones, las búsquedas de nucleótidos de BLAST se pueden realizar con el programa NBLAST, puntuación=100, longitud de palabra=12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a las moléculas de ácidos nucleicos de la invención. En algunas realizaciones, para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y BLAST) (véase [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

*Identidad:* Como se usa en el presente documento, "identidad" significa el porcentaje de restos de nucleótidos idénticos en posiciones correspondientes en dos o más secuencias cuando las secuencias se alinean para maximizar el apareamiento de secuencias, es decir, teniendo en cuenta huecos e inserciones. La identidad puede ser fácilmente calculada por métodos conocidos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos en (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48: 1073 (1988)). Los métodos de determinación de la identidad se diseñan para dar la mayor correspondencia entre las secuencias probadas. Además, los métodos de determinación de la identidad están codificados en programas informáticos públicamente disponibles. Los métodos de programas informáticos para determinar la identidad entre dos secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete de programas GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Research 12(1): 387 (1984)), BLASTP, BLASTN y FASTA (Altschul, S. F. et al., J. Molec. Biol. 215: 403-410 (1990) y Altschul et al. Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402 (1997)). El programa BLAST X está públicamente disponible de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)). También se puede usar el algoritmo de Smith-Waterman bien conocido para determinar la identidad.

*Heterólogo:* Una región "heteróloga" de una secuencia de ADN es un segmento de ADN identificable dentro de una secuencia de ADN mayor que no se encuentra en asociación con la secuencia mayor en la naturaleza. Por lo tanto, cuando la región heteróloga codifica un gen de mamífero, el gen puede estar flanqueado normalmente por ADN que

no flanquea el ADN genómico de mamífero en el genoma del organismo fuente. Otro ejemplo de una secuencia codificante heteróloga es una secuencia donde la secuencia codificante en sí misma no se encuentra en la naturaleza (por ejemplo, un ADNc donde la secuencia codificante genómica contiene intrones o secuencias sintéticas que tienen codones o motivos diferentes del gen sin modificar). Las variaciones alélicas o acontecimientos mutacionales naturales no dan lugar a una región de ADN heteróloga como se define en el presente documento.

*Mutación de transición:* El término "mutaciones de transición" se refiere a cambios de bases en una secuencia de ADN en la que una pirimidina (citidina (C) o timidina (T)) se sustituye por otra pirimidina, o una purina (adenosina (A) o guanosina (G)) se sustituye por otra purina.

*Mutación de transversión:* El término "mutaciones de transversión" se refiere a cambios de bases en una secuencia de ADN en la que una pirimidina (citidina (C) o timidina (T)) se sustituye por una purina (adenosina (A) o guanosina (G)), o una purina se sustituye por una pirimidina.

*Oligonucleótido:* El término "oligonucleótido" se refiere a un polímero u oligómero de monómeros de nucleótidos, que contiene cualquier combinación de nucleobases, nucleobases modificadas, azúcares, azúcares modificados, puentes de fosfato, o puentes de átomos de fósforo modificados (también denominados en el presente documento "enlace internucleotídico", definido además en el presente documento).

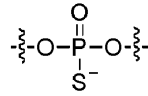
Los oligonucleótidos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Como se usa en el presente documento, el término "cadena de oligonucleótidos" engloba un oligonucleótido monocatenario. Un oligonucleótido monocatenario puede tener regiones bicatenarias y un oligonucleótido bicatenario puede tener regiones monocatenarias. Los oligonucleótidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y de terminación, sistemas autorreplicantes, tales como ADN vírico o de plásmido, ARNip monocatenario y bicatenario y otros reactivos de interferencia de ARN (agentes de iARN o agentes ARNi), ARNhp, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN, miméticos de microARN, supermir, aptámeros, antimir, antagomir, adaptadores de UI, oligonucleótidos formadores de tríplex, oligonucleótidos G-quadruplex, activadores de ARN, oligonucleótidos inmunoestimulantes y oligonucleótidos señuelo.

Los oligonucleótidos bicatenarios y monocatenarios que son eficaces en inducir la interferencia por ARN también se denominan ARNip, agente de iARN o agente de ARNi, en el presente documento. En algunas realizaciones, estos oligonucleótidos inductores de interferencia de ARN se asocian con un complejo citoplásmico multiprotéico conocido como complejo de silenciamiento inducido por iARN (RISC). En muchas realizaciones, los agentes de iARN monocatenarios y bicatenarios son lo suficientemente largos como para que puedan ser escindidos por una molécula endógena, por ejemplo, por Dicer, para producir oligonucleótidos más pequeños que pueden entrar en la maquinaria del RISC y participar en la escisión mediada por RISC de una secuencia diana, por ejemplo un ARNm diana.

Los oligonucleótidos de la presente invención pueden ser de diversas longitudes. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden variar desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 200 nucleótidos de longitud. En diversas realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, monocatenarios, bicatenarios y tricatenarios, pueden variar en longitud desde aproximadamente 4 hasta aproximadamente 10 nucleótidos, desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 nucleótidos, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene desde aproximadamente 9 hasta aproximadamente 39 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 4 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 5 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 6 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 7 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 8 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 9 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 10 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 11 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 12 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 15 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 20 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 25 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene al menos 30 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene un dúplex de cadenas complementarias de al menos 18 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, el oligonucleótido tiene un dúplex de cadenas complementarias de al menos 21 nucleótidos de longitud.

*Enlace internucleotídico:* Como se usa en el presente documento, la expresión "enlace internucleotídico" se refiere, en general, al enlace que contiene fósforo entre las unidades de nucleótidos de un oligonucleótido, y es intercambiable con "enlace inter-azúcar" y "puentes de átomos de fósforo", como se usa anteriormente y en el presente documento. En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico es un enlace fosfodiéster, como se encuentra en moléculas de ADN de y ARN naturales. En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico es un "enlace internucleotídico modificado" en donde cada átomo de oxígeno del enlace fosfodiéster está opcionalmente e independientemente sustituido con un resto orgánico o inorgánico. En algunas realizaciones, dicho resto orgánico o inorgánico se selecciona de, pero no se limita a, =S, =Se, =NR', -SR', -SeR', -N(R')<sub>2</sub>, B(R')<sub>3</sub>, -S-, -Se- y -N(R')-, en donde cada R' es independientemente como se define y se describe

a continuación. En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico es un enlace fosfotriéster, enlace diéster de fosforotioato (



5 ) o enlace triéster de fosforotioato modificado. Se entiende por un experto habitual en la técnica que el enlace internucleotídico puede existir como un anión o catión a un pH dado debido a la existencia de restos de ácido o base en el enlace.

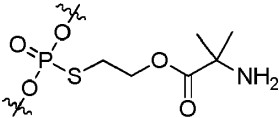
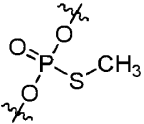
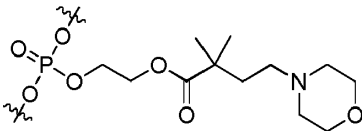
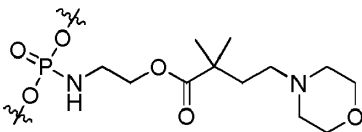
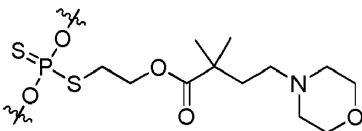
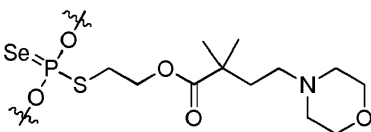
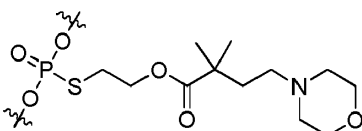
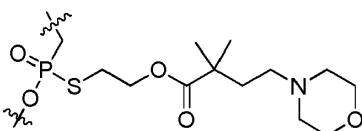
10 A menos que se especifique de otro modo, cuando se usa con una secuencia de oligonucleótidos, cada uno de s, s1, s2, s3, s4, s5, s6 y s7 representa independientemente el siguiente enlace internucleotídico modificado como se ilustra en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Enlace internucleotídico modificado a modo de ejemplo.

15

Símbolo	Enlace internucleotídico modificado
s	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{---O---P---O---} \\   \\ \text{S}^- \end{array}$ fosforotioato ( )
s1	
s2	
s3	
s4	
s5	
s6	

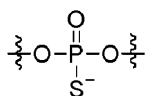
ES 2 917 473 T3

Símbolo	Enlace internucleotídico modificado
	
s7	
s8	
s9	
s10	
s11	
s12	
s13	
s14	



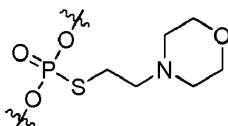
Símbolo	Enlace internucleotídico modificado
s15	
s16	
s17	
s18	

Por ejemplo, (*Rp*, *Sp*)-ATsCs1GA tiene 1) un enlace internucleotídico de fosforotioato (



5

) entre T y C; y 2) un enlace internucleotídico de triéster de fosforotioato que tiene la estructura de



10

entre C y G. A menos que se especifique de otro modo, las designaciones *Rp/Sp* que preceden a una secuencia de oligonucleótidos describen las configuraciones de átomos de fósforo quirales del enlace en los enlaces internucleotídicos uno detrás del otro desde 5' hasta 3' de la secuencia de oligonucleótidos. Por ejemplo, en (*Rp*, *Sp*)-ATsCs1GA, el fósforo en el enlace "s" entre T y C tiene la configuración *Rp* y el fósforo en el enlace "s1" entre C y G tiene la configuración *Sp*. En algunas realizaciones, "Todos-(*Rp*)" o "Todos-(*Sp*)" se usa para indicar que todos los átomos de fósforo quirales del enlace en el oligonucleótido tienen la misma configuración *Rp* o *Sp*, respectivamente. Por ejemplo, Todos-(*Rp*)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC (SEQ ID NO: 1) indica que todos los átomos de fósforo quirales del enlace en el oligonucleótido tienen la configuración *Rp*; Todos-(*Sp*)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC (SEQ ID NO: 2) indica que todos los átomos de fósforo quirales del enlace en el oligonucleótido tienen la configuración *Sp*.

15

20

*Tipo de oligonucleótido:* Como se usa en el presente documento, la expresión "tipo de oligonucleótido" se usa para definir un oligonucleótido que tiene una secuencia de bases particular, patrón de enlaces del esqueleto (es decir, patrón de tipos de enlaces internucleotídicos, por ejemplo, fosfato, fosforotioato, etc.), patrón de centros quirales del esqueleto (es decir, patrón de estereoquímica del fósforo del enlace ( $R_p/S_p$ )) y patrón de las modificaciones del fósforo del esqueleto (por ejemplo, patrón de grupos "-XLR<sup>1</sup>" en la fórmula I). Los oligonucleótidos de un "tipo" designado común son estructuralmente idénticos entre sí.

Un experto en la técnica apreciará que los métodos de síntesis de la presente invención proporcionan un grado de control durante la síntesis de una cadena de oligonucleótidos tal que cada unidad de nucleótido de la cadena de oligonucleótidos se pueda diseñar y/o seleccionar por adelantado para tener una estereoquímica particular en el fósforo del enlace y/o una modificación particular en el fósforo del enlace, y/o una base particular, y/o un azúcar particular. En algunas realizaciones, una cadena de oligonucleótidos se diseña y/o selecciona por adelantado para tener una combinación particular de estereocentros en el fósforo del enlace. En algunas realizaciones, una cadena de oligonucleótidos se diseña y/o determina para tener una combinación particular de modificaciones en el fósforo del enlace. En algunas realizaciones, una cadena de oligonucleótidos se diseña y/o selecciona para tener una combinación particular de bases. En algunas realizaciones, una cadena de oligonucleótidos se diseña y/o selecciona para tener una combinación particular de una o más de las características estructurales anteriores. La presente invención proporciona composiciones que comprenden o que consisten en una pluralidad de moléculas de oligonucleótido (por ejemplo, composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados). En algunas realizaciones, todas las moléculas son del mismo tipo (es decir, son estructuralmente idénticas entre sí). En muchas realizaciones, sin embargo, las composiciones proporcionadas comprenden una pluralidad de oligonucleótidos de diferentes tipos, normalmente en cantidades predeterminadas relativas.

*Control quiral:* Como se usa en el presente documento, "control quiral" se refiere a la capacidad para controlar la designación estereoquímica de cada fósforo del enlace quiral dentro de una cadena de oligonucleótidos. La expresión "oligonucleótido quiralmente controlado" se refiere a un oligonucleótido que existe en una única forma diaestereomérica con respecto al fósforo del enlace quiral.

*Composición de oligonucleótidos quiralmente controlados:* Como se usa en el presente documento, la expresión "composición de oligonucleótidos quiralmente controlados" se refiere a una composición de oligonucleótidos que contiene niveles predeterminados de tipos de oligonucleótidos individuales. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende más de un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende una mezcla de múltiples tipos de oligonucleótidos. Las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados a modo de ejemplo se describen más adelante en el presente documento.

*Quiralmente puro:* Como se usa en el presente documento, la expresión "quiralmente puro" se usa para describir una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados en la que todos los oligonucleótidos existen en una única forma diaestereomérica con respecto al fósforo del enlace.

*Quiralmente uniforme:* como se usa en el presente documento, la expresión "quiralmente uniforme" se usa para describir una molécula o tipo de oligonucleótido en que todas las unidades de nucleótidos tienen la misma estereoquímica en el fósforo del enlace. Por ejemplo, un oligonucleótido cuyas unidades de nucleótido tengan todos estereoquímica  $R_p$  en el fósforo del enlace es quiralmente uniforme. Asimismo, un oligonucleótido cuyas unidades de nucleótido tengan todas estereoquímica  $S_p$  en el fósforo del enlace es quiralmente uniforme.

*Predeterminado:* Por predeterminado se indica deliberadamente seleccionado, por ejemplo a diferencia de que ocurre o se logra aleatoriamente. Los expertos habituales en la técnica, que leen la presente memoria descriptiva, apreciarán que la presente invención proporciona nuevas y sorprendentes tecnologías que permiten la selección de tipos de oligonucleótidos particulares para la preparación y/o inclusión en composiciones proporcionadas, y permite además la preparación controlada de precisamente los tipos particulares seleccionados, opcionalmente en cantidades relativas particulares seleccionadas, de manera que se preparen las composiciones proporcionadas. Dichas composiciones proporcionadas están "predeterminadas", como se describe en el presente documento. Las composiciones que pueden contener ciertos tipos de oligonucleótidos individuales debido a que se han generado a través de un proceso que no se puede controlar para generar intencionadamente los tipos de oligonucleótidos particulares no son una composición "predeterminada". En algunas realizaciones, una composición predeterminada es una que puede ser intencionadamente reproducida (por ejemplo, mediante la repetición de un proceso controlado).

*Fósforo del enlace:* Como se define en el presente documento, la expresión "fósforo del enlace" se usa para indicar que el átomo de fósforo particular que se denomina es el átomo de fósforo presente en el enlace internucleotídico, átomo de fósforo que corresponde al átomo de fósforo de un fosfodiéster de un enlace internucleotídico como ocurre en el ADN y ARN natural. En algunas realizaciones, un átomo de fósforo del enlace está en un enlace internucleotídico modificado, en donde cada átomo de oxígeno de un enlace fosfodiéster está opcionalmente e independientemente sustituido con un resto orgánico o inorgánico. En algunas realizaciones, un átomo de fósforo del enlace es  $P^*$  de la

fórmula I. En algunas realizaciones, un átomo de fósforo del enlace es quiral. En algunas realizaciones, un átomo de fósforo del enlace quiral es P\* de la fórmula I.

5 *Modificación en P:* Como se usa en el presente documento, el término "modificación en P" se refiere a cualquier modificación en el fósforo del enlace distinta de una modificación estereoquímica. En algunas realizaciones, una modificación en P comprende la adición, sustitución o retirada de un resto lateral covalentemente unido a un fósforo del enlace. En algunas realizaciones, la "modificación en P" es -X-L-R<sup>1</sup>, en donde cada uno de X, L y R<sup>1</sup> es independientemente como se define y se describe en el presente documento y a continuación.

10 *Blockmero:* El término "blockmero", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de oligonucleótidos cuyo patrón de características estructurales que caracterizan cada unidad de nucleótido individual se caracteriza por la presencia de al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas que comparten una característica estructural común en el enlace internucleotídico de fósforo. Por característica estructural común se indica la estereoquímica común en el fósforo del enlace o una modificación común en el fósforo del enlace. En algunas realizaciones, las al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas que comparten una característica estructural común en el enlace internucleotídico de fósforo se denominan un "bloque" ("block").

20 En algunas realizaciones, un blockmero es un "estereoblockmero", por ejemplo, al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas tienen la misma estereoquímica en el fósforo del enlace. Dichas al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas forman un "estereobloque". Por ejemplo, (Sp, Sp)-ATsCs1GA es un estereoblockmero debido a que al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas, Ts y Cs1, tienen la misma estereoquímica en el fósforo del enlace (ambas Sp). En el mismo oligonucleótido (Sp, Sp)-ATsCs1GA, TsCs1 forma un bloque, y es un estereobloque.

25 En algunas realizaciones, un blockmero es un "blockmero de modificación en P", por ejemplo, al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas tienen la misma modificación en el fósforo del enlace. Dichas al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas forman un "bloque de modificación en P". Por ejemplo, (Rp, Sp)-ATsCsGA es un blockmero de modificación en P debido en el que al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas, Ts y Cs, tienen la misma modificación en P (es decir, ambas son un diéster de fosforotioato). En el mismo oligonucleótido de (Rp, Sp)-ATsCsGA, TsCs forma un bloque, y es un bloque de modificación en P.

30 En algunas realizaciones, un blockmero es un "blockmero de enlace", por ejemplo, al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas tienen estereoquímica idéntica y modificaciones idénticas en el fósforo del enlace. Al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas forman un "bloque de enlace". Por ejemplo, (Rp, Rp)-ATsCsGA es un blockmero de enlace debido a que al menos dos unidades de nucleótidos consecutivas, Ts y Cs, tienen la misma estereoquímica (ambas Rp) y modificación en P (ambas fosforotioato). En el mismo oligonucleótido de (Rp, Rp)-ATsCsGA, TsCs forma un bloque, y es un bloque de enlace.

40 En algunas realizaciones, un blockmero comprende uno o más bloques seleccionados independientemente de un estereobloque, un bloque de modificación en P y un bloque de enlace. En algunas realizaciones, un blockmero es un estereoblockmero con respecto a un bloque, y/o un blockmero de modificación en P con respecto a otro bloque, y/o un blockmero de enlace con respecto a otro bloque más. Por ejemplo, (Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)-AAsTsCsGsAs1Ts1Cs1Gs1ATCG (SEQ ID NO: 3) es un estereoblockmero con respecto al estereobloque AsTsCsGsAs1 (todos Rp en el fósforo del enlace) o Ts1Cs1Gs1 (todos Sp en el fósforo del enlace), un blockmero de modificación en P con respecto al bloque de modificación en P AsTsCsGs (todos enlace s) o As1Ts1Cs1Gs1 (todos enlace s1), o un blockmero de enlace con respecto al bloque de enlace AsTsCsGs (todos Rp en el fósforo del enlace y todos enlace s) o Ts1Cs1Gs1 (todos Sp en el fósforo del enlace y todos enlace s1).

50 *Altmero:* el término "altmero", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de oligonucleótidos cuyo patrón de características estructurales que caracteriza cada unidad de nucleótido individual se caracteriza porque dos unidades de nucleótidos consecutivas de la cadena de oligonucleótidos no comparten una característica estructural particular en el enlace internucleotídico de fósforo. En algunas realizaciones, se diseña un altmero de forma que comprenda un patrón de repetición. En algunas realizaciones, se diseña un altmero de forma que no comprenda un patrón de repetición.

55 En algunas realizaciones, un altmero es un "estereoaltmero", por ejemplo, dos unidades de nucleótidos consecutivas no tienen la misma estereoquímica en el fósforo del enlace. Por ejemplo, (Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC (SEQ ID NO: 4).

60 En algunas realizaciones, un altmero es un "altmero de modificación en P", por ejemplo, dos unidades de nucleótidos consecutivas no tienen la misma modificación en el fósforo del enlace. Por ejemplo, Todo-(Sp)-CAs1GsT, en la que cada fósforo del enlace tiene una modificación en P diferente de las otras.

65 En algunas realizaciones, un altmero es un "altmero de enlace", por ejemplo, dos unidades de nucleótidos consecutivas no tienen estereoquímica idéntica o modificaciones idénticas en el fósforo del enlace. Por ejemplo, (Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-GsCs1CsTs1CsAs1GsTs1CsTs1GsCs1TsTs2CsGs3 CsAs4CsC (SEQ ID NO: 5).

*Unúmero*: El término "unúmero", como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de oligonucleótidos cuyo patrón de características estructurales que caracteriza cada unidad de nucleótido individual es tal que todas las unidades de nucleótidos dentro de la cadena compartan al menos una característica estructural común en el enlace internucleotídico de fósforo. Por característica estructural común se indica la estereoquímica común en el fósforo del enlace o una modificación común en el fósforo del enlace.

En algunas realizaciones, un unúmero es un "estereounúmero", por ejemplo, todas las unidades de nucleótido tienen la misma estereoquímica en el fósforo del enlace. Por ejemplo, Todo-(Sp)-CsAs1GsT, en el que todos los enlaces tienen fósforo Sp.

En algunas realizaciones, un unúmero es un "unúmero de modificación en P", por ejemplo, todas las unidades de nucleótidos tienen la misma modificación en el fósforo del enlace. Por ejemplo, (Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC (SEQ ID NO: 6), en el que todos los enlaces internucleotídicos son diéster de fosforotioato.

En algunas realizaciones, un unúmero es un "unúmero de enlace", por ejemplo, todas las unidades de nucleótidos tienen la misma estereoquímica y las mismas modificaciones en el fósforo del enlace. Por ejemplo, Todo-(Sp)-GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGsCsAsCsC (SEQ ID NO: 7), en el que todos los enlaces internucleotídicos son diéster de fosforotioato que tienen fósforo del enlace Sp.

*Gápmero*: Como se usa en el presente documento, el término "gápmero" se refiere a una cadena de oligonucleótidos caracterizada porque al menos un enlace internucleotídico de fósforo de la cadena de oligonucleótidos es un enlace de diéster de fosfato, por ejemplo tal como el que existe en ADN o ARN natural. En algunas realizaciones, más de un enlace internucleotídico de fósforo de la cadena de oligonucleótidos es un enlace de diéster de fosfato, tal como el encontrado en ADN o ARN natural. Por ejemplo, Todo-(Sp)-CAs1GsT, en el que el enlace internucleotídico entre C y A es un enlace de diéster de fosfato.

*Skipmero*: Como se usa en el presente documento, el término "skipmero" se refiere a un tipo de gápmero en el que cada otro enlace internucleotídico de fósforo de la cadena de oligonucleótidos es un enlace de diéster de fosfato, por ejemplo tal como los encontrados en ADN o ARN natural, y cada otro enlace internucleotídico de fósforo de la cadena de oligonucleótidos es un enlace internucleotídico modificado. Por ejemplo, Todo-(Sp)-AsTCs1GAs2TCs3G.

Para los fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican según la Periodic Table of the Elements, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 67<sup>a</sup> Ed., 1986-87, interior de la cubierta.

Los métodos y las estructuras descritos en el presente documento referentes a los compuestos y las composiciones de la invención también se aplican a las sales de adición de ácido o base farmacéuticamente aceptables y a todas las formas estereoisoméricas de estos compuestos y composiciones.

## Breve descripción del dibujo

*Figura 1.* HPLC de fase inversa después de la incubación con homogeneizado de hígado de rata. Se midieron cantidades totales de oligonucleótidos que quedan cuando se incuban con homogeneizado de hígado completo de rata a 37 °C en diferentes días. Se encontró que la estabilidad metabólica *in vitro* de ONT-154 es similar a la de ONT-87 que tiene alas 2'-MOE, mientras que ambos tienen una estabilidad mucho mejor que el gápmero 2'-MOE que es estereoaleatorio (ONT-41, mipomersen). La cantidad de oligómero de longitud completa que queda se midió por HPLC de fase inversa donde el área de picos del pico de interés se normalizó con patrón interno.

*Figura 2.* Degradación de diversos análogos quiralmente puros de mipomersen (ONT-41) en homogeneizado de hígado completo de rata. Se midieron cantidades totales de oligonucleótido que quedan cuando se incuban con homogeneizado de hígado completo de rata a 37 °C en diferentes días. Se encontró que la estabilidad metabólica *in vitro* de los diaestereómeros quiralmente puros de la secuencia de ApoB humana ONT-41 (mipomersen) aumentaba al aumentar los enlaces internucleotídicos Sp. Se midió por HPLC de fase inversa la cantidad de oligómero de longitud completa que queda donde el área de picos del pico de interés se normalizó con patrón interno.

*Figura 3.* Degradación de diversos análogos quiralmente puros de la secuencia de ApoB de ratón (ISIS 147764, ONT-83) en homogeneizado de hígado completo de rata. Se midieron cantidades totales de oligonucleótido que quedan cuando se incuban con homogeneizado de hígado completo de rata a 37 °C en diferentes días. Se encontró que la estabilidad metabólica *in vitro* de los diaestereómeros quiralmente puros de la secuencia de ApoB murina (ONT-83, gápmero 2'-MOE, fosforotioato estereoaleatorio) aumentaba al aumentar los enlaces internucleotídicos Sp. Se midió por HPLC de fase inversa la cantidad de oligómero de longitud completa que queda donde el área de picos del pico de interés se normalizó con patrón interno.

*Figura 4.* Degradación del análogo de mipomersen ONT-75 en homogeneizado de hígado completo de rata durante un periodo de 24 horas. Esta figura ilustra la estabilidad de ONT-75 en homogeneizado de hígado completo de rata.

5 *Figura 5.* Degradación del análogo de mipomersen ONT-81 en homogeneizado de hígado completo de rata durante un periodo de 24 horas. Esta figura ilustra la estabilidad de ONT-81 en homogeneizado de hígado completo de rata.

10 *Figura 6.* Duraciones de la atenuación de ONT-87, ONT-88 y ONT-89. Los estereoisómeros pueden presentar duraciones sustancialmente diferentes de la atenuación. ONT-87 produce supresión sustancialmente más duradera que otros estereoisómeros. Se observó la elevada duración de la acción de ONT-87 en múltiples estudios *in vivo*. ONT-88 mostró eficacia y perfil de recuperación similares a ONT-41 (mipomersen) en ciertos estudios *in vivo*. Se administró a ratones transgénicos ApoB hu, n=4, con 10 mpk de bolo IP, 2X/semana durante tres semanas. Los ratones se aleatorizaron a grupos de estudio, y se les administró por vía intraperitoneal (IP) 10 mg/kg en los días 1, 4, 8, 11, 15, 18 y 22, basado en el peso corporal de ratón individual medido antes de la administración en cada día de dosis. Se recogió la sangre en los días 0, 17, 24, 31, 38, 45 y 52 por sangrado submandibular (mejilla) y en el sacrificio en el día 52 por punción cardíaca y luego se procesó dando suero. Se midió ApoB por ELISA. Subrayado: Se mantuvo el 72 % frente al 35 % de atenuación 3 semanas después de la dosis.

20 *Figura 7.* Perfiles de HPLC que presentan la diferencia en la estabilidad metabólica determinada en suero humano para dúplex de ARNip que tienen varios enlaces fosforotioato *Rp*, *Sp* o estereoaleatorios.

25 *Figura 8.* Efecto de la estereoquímica sobre la actividad de RNasa H. Se hibridaron los oligonucleótidos antisentido con ARN y luego se incubaron con RNasa H a 37 °C en presencia de tampón IX RNasa H. De arriba a abajo a los 120 min: ONT-89, ONT-77, ONT-81, ONT-80, ONT-75, ONT-41, ONT-88, ONT-154, ONT-87, con ONT-77/154 muy próximos entre sí.

30 *Figura 9.* Análisis de la escisión por RNasa HI humana de un ARN 20mero cuando se hibridó con diferentes preparaciones de estereoisómeros de oligonucleótidos de fosforotioato que se dirigen a la misma región de ARNm de ApoB humana. Los sitios específicos de escisión están influenciados fuertemente por las distintas estereoquímicas. Las flechas representan la posición de escisión (sitios de escisión). Los productos se analizaron por UPLC/MS. La longitud de la flecha significa la cantidad de productos presentes en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento (cuanto más grande sea la flecha, más es la cantidad de productos de escisión detectados). (A): Leyenda de los mapas de escisión. (B) y (C): Mapas de escisión de oligonucleótidos.

35 *Figura 10.* Mapas de escisión de diferentes composiciones de oligonucleótidos ((A)-(C)). Estas tres secuencias se dirigen a diferentes regiones en ARNm de FOXO1. Cada secuencia se estudió con cinco químicas diferentes. Los mapas de escisión derivan de mezclas de reacción obtenidas después de 30 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las flechas indican sitios de escisión. (⊥) indica que se identificaron ambos fragmentos, la especie de 5'-fosfato así como la especie de 5'-OH 3'-OH, en las mezclas de reacción. (⊂) indica que solo se detectó la especie de 5'-fosfato y (⊃) indica que se detectó el componente de 5'-OH 3'-OH en el análisis de espectrometría de masas. La longitud de la flecha significa la cantidad de productos presentes en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento (cuanto más grande sea la flecha, más es la cantidad de productos de escisión detectados). Solo en el caso donde no se detectó 5'-OH 3'-OH en la mezcla de reacción, se usó el pico de la especie de 5'-fosfato para la cuantificación. Las tasas de escisión se determinaron midiendo la cantidad de ARN de longitud completa que queda en las mezclas de reacción por HPLC de fase inversa. Las reacciones se inactivaron en momentos de tiempo fijos por Na<sub>2</sub>EDTA 30 mM.

40 *Figura 11.* Mapas de escisión de composiciones de oligonucleótidos que tienen diferentes secuencias de bases y longitudes comunes ((A)-(B)). Los mapas muestran una comparación de composiciones de ADN estereoaleatorio (panel superior) con tres composiciones de oligonucleótidos distintas y estereoquímicamente puras. Los datos comparan los resultados de composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados con dos composiciones de oligonucleótidos de fosforotioato estereoaleatorios (ONT-366 y ONT-367) que se dirigen a diferentes regiones en ARNm de FOXO1. Cada panel muestra una comparación de ADN estereoaleatorio (panel superior) con tres preparaciones de oligonucleótidos distintas y estereoquímicamente puras. Mapas de escisión derivaron de mezclas de reacción obtenidas después de 30 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las flechas indican sitios de escisión. (⊥) indica que se identificaron ambos fragmentos, la especie de 5'-fosfato así como la especie de 5'-OH 3'-OH, en las mezclas de reacción. (⊂) indica que solo se detectó la especie de 5'-fosfato y (⊃) indica que el componente de 5'-OH 3'-OH se detectó en el análisis de espectrometría de masas. La longitud de la flecha significa la cantidad de metabolito presente en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento (cuanto más

grande sea la flecha, más es la cantidad de productos de escisión detectados). Solo en el casos donde no se detectó 5'-OH 3'-OH en la mezcla de reacción, se usó el pico de la especie de 5'-fosfato para la cuantificación.

*Figura 12.* Efecto de la estereoquímica sobre la actividad de RNasa H. En dos experimentos independientes, oligonucleótidos antisentido que se dirigen a una región idéntica de ARNm de FOXO1 se hibridaron con ARN y luego se incubaron con RNasa H a 37 °C en presencia de tampón IX RNasa H. La desaparición de ARN de longitud completa se midió a partir de su área de picos a 254 nm usando RP-HPLC. (A): de arriba a abajo a los 60 min: ONT-355, ONT-316, ONT-367, ONT-392, ONT-393 y ONT-394 (ONT-393 y ONT-394 aproximadamente lo mismo a 60 min; ONT-393 tuvo mayor % de sustrato de ARN que quedaba a los 5 min). (B): de arriba a abajo a los 60 min: ONT-315, ONT-354, ONT-366, ONT-391, ONT-389 y ONT-390. Las tasas de escisión se determinaron midiendo la cantidad de ARN de longitud completa que queda en las mezclas de reacción por HPLC de fase inversa. Las reacciones se inactivaron en momentos de tiempo fijos por Na<sub>2</sub>EDTA 30 mM.

*Figura 13.* Renovación de oligonucleótidos antisentido. Se prepararon los dúplex con cada concentración de cadena de ADN igual a 6 μM y siendo el ARN 100 μM. Estos dúplex se incubaron con enzima RNasa H 0,02 μM y se midió la desaparición de ARN de longitud completa a partir de su área de picos a 254 nm usando RP-HPLC. Las tasas de escisión se determinaron midiendo la cantidad de ARN de longitud completa que queda en las mezclas de reacción por HPLC de fase inversa. Las reacciones se inactivaron en momentos de tiempo fijos por Na<sub>2</sub>EDTA 30 mM. De arriba a abajo a los 40 min: ONT-316, ONT-367 y ONT-392.

*Figura 14.* Masa de escisión que compara un oligonucleótido de fosforotioato estereoaleatorio con seis preparaciones de oligonucleótidos distintas y estereoquímicamente puras que se dirigen a la misma región de ARNm de FOXO1.

*Figura 15.* Efecto de la estereoquímica sobre la actividad de RNasa H. Se hibridaron los oligonucleótidos antisentido con ARN y luego se incubaron con RNasa H a 37 °C en presencia de tampón IX RNasa H. Se observó la dependencia de la estereoquímica de la actividad de RNasa H. También es evidente comparando ONT-367 (ADN estereoaleatorio) y ONT-316 (gápmo 5-10-5 2'-MOE) la fuerte dependencia de la química composicional de la actividad de RNasa H. De arriba a abajo a los 40 min: ONT-316, ONT-421, ONT-367, ONT-392, ONT-394, ONT-415 y ONT-422 (ONT-394/415/422 tienen niveles similares a los 40 min; a los 5 min, ONT-422 > ONT-394 > ONT-415 en % de ARN que queda en el dúplex de ADN/ARN).

*Figura 16.* Efecto de la estereoquímica sobre la actividad de RNasa H. Se hibridaron oligonucleótidos antisentido que se dirigen a una región idéntica de ARNm de FOXO1 con ARN y luego se hibridaron con RNasa H a 37 °C en presencia de tampón IX RNasa H. Se observó la dependencia de la estereoquímica de la actividad de RNasa H. De arriba a abajo a los 40 min: ONT-396, ONT-409, ONT-414, ONT-408 (ONT-396/409/414/408 tienen niveles similares a 40 min), ONT-404, ONT-410, ONT-402 (ONT-404/410/408 tienen niveles similares a los 40 min), ONT-403, ONT-407, ONT-405, ONT-401, ONT-406 y ONT-400 (ONT-401/405/406/400 tienen niveles similares a los 40 min).

*Figura 17.* Efecto de la estereoquímica sobre la actividad de RNasa H. Se hibridaron oligonucleótidos antisentido que se dirigen a una región idéntica de ARNm de FOXO1 con ARN y luego se hibridaron con RNasa H a 37 °C en presencia de tampón IX RNasa H. Se observó la dependencia de la estereoquímica de la actividad de RNasa H. Se observó que ONT-406 provocaba la escisión de ARN de dúplex a una tasa en ligero exceso de la del oligonucleótido de fosfodiéster ONT-415. De arriba a abajo a los 40 min: ONT-396, ONT-421, ONT-392, ONT-394, ONT-415 ONT-406 y ONT-422 (ONT-394/415/406 tienen niveles similares a los 40 min; a 5 min, ONT-394 > ONT-415 > ONT-406 en % de ARN que queda en el dúplex de ADN/ARN).

*Figura 18.* Cromatogramas de UV a modo de ejemplo de productos de escisión de ARN obtenidos cuando el ARN (ONT-388) se duplexó con ADN estereoaleatorio, ONT-367 (arriba) y ADN estereopuro con motivo de repetición triplete-3'-SSR-5', ONT-394 (abajo).). 2,35 min: 7mero; 3,16 min: 8mero y p-6mero; 4,48 min: P-7mero; 5,83 min: P-8mero; 6,88 min: 12mero; 9,32 min: 13mero; 10,13 min: P-11-mer; 11,0 min: P-12mero y 14mero; 11,93 min: P-13mero; 13,13 min: P-14mero. Asignación de picos de ONT-394 (en la parte inferior): 4,55 min: p-7mero; 4,97 min: 10mero; 9,53 min: 13mero.

*Figura 19.* Espectro de ionización por electropulverización de productos de escisión de ARN. Se incubaron fragmentos de ARN obtenidos del dúplex ONT-387, ARN/ONT-354 (7-6-7, ADN-2'-OMe-ADN) arriba y ONT-387, ARN/ONT-315, (gápmo 5-10-5,2'-MOE) abajo cuando estos se duplexan con RNasa H durante 30 min en presencia de tampón IX RNasa H.

*Figura 20.* Cromatograma de UV y TIC de dúplex de ONT-406 y ONT-388 después de 30 minutos de incubación con RNasa H.

*Figura 21.* Una escisión propuesta a modo de ejemplo. Las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionadas son capaces de escindir dianas como se representa.

Figura 22. Escisión específica de alelo a modo de ejemplo que se dirige a ARNm de huntingtina mutante. (A) y (B): Oligonucleótidos a modo de ejemplo. (C)-(E): Mapas de escisión. (F)-(H): Escisión de ARN. Se prepararon composiciones de oligonucleótidos estereoealeatorios y quiralmemente controlados para dirigir polimorfismos de un solo nucleótido para la supresión selectiva de alelo de huntingtina mutante. ONT-450 (estereoealeatorio) que se dirige a ONT-453 (muHTT) y ONT-454 (wtHTT) mostró diferenciación marginal en la escisión de ARN y sus mapas de escisión. ONT-451 quiralmemente controlado con colocación selectiva del motivo 3'-SSR-5' en el sitio de reconocimiento de RNasa H que se dirige a ONT-453 (muHTT) y ONT-454 (wtHTT) mostró una gran diferenciación en la tasa de escisión de ARN. Del mapa de escisión, no es notable que el motivo 3'-SSR-5' se coloque para dirigir la escisión entre las posiciones 8 y 9 que es después del desapareamiento si se lee desde el extremo 5' de ARN. ONT-452 con colocación selectiva del motivo de 3'-SSR-5' en el sitio de reconocimiento de RNasa H que se dirige a ONT-453 (muHTT) y ONT-454 (wtHTT) mostró una diferenciación moderada en la tasa de escisión de ARN. El motivo de 3'-SSR-5' se colocó para dirigir la escisión en las posiciones 7 y 8 que está antes del desapareamiento si se lee desde el extremo 5' de ARN. Los datos a modo de ejemplo ilustran significancia de la posición en la colocación del motivo 3'-SSR-5' para lograr una mejorada discriminación de la escisión específica de alelo. Todos los mapas de escisión derivan de las mezclas de reacción obtenidas después de 5 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las flechas indican sitios de escisión. (⊥) indica que se identificaron ambos fragmentos, la especie de 5'-fosfato así como la especie de 5'-OH 3'-OH, en mezclas de reacción. (⊥) indica que solo se detectó la especie de 5'-fosfato y (⊥) indica que el componente de 5'-OH 3'-OH se detectó en el análisis de espectrometría de masas. La longitud de la flecha significa la cantidad de metabolito presente en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento. Solo en el caso donde no se detectó 5'-OH 3'-OH en la mezcla de reacción, se usó el pico de la especie de 5'-fosfato para la cuantificación.

Figura 23. (A)-(C): Escisión específica de alelo a modo de ejemplo que se dirige a ARNm de FOXO1.

Figura 24. Silenciamiento de la respuesta a dosis *in vitro* de ARNm de ApoB después del tratamiento con oligonucleótidos de ApoB. Los diaestereómeros estereoquímicamente puros con y sin alas 2'-MOE muestran eficacia similar a ONT-41 (mipomersen).

Figura 25. Comparación de mapas de escisión de RNasa H (A) y tasas de escisión de ARN (B) para la composición estereoealeatoria (ONT-367) y composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados (ONT-421, todos Sp y ONT-455, todos Rp) y ADN (ONT-415). Estas secuencias se dirigen a la misma región en ARNm de FOXO1. Los mapas de escisión derivaron de las mezclas de reacción obtenidas después de 5 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las flechas indican sitios de escisión. (⊥) indica que se identificaron ambos fragmentos, la especie de 5'-fosfato así como la especie de 5'-OH 3'-OH, en mezclas de reacción. (⊥) indica que solo se detectó la especie de 5'-fosfato y (⊥) indica que el componente de 5'-OH 3'-OH se detectó en el análisis de espectrometría de masas. La longitud de la flecha significa la cantidad de metabolito presente en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento. Solo en el caso donde no se detectó 5'-OH 3'-OH en la mezcla de reacción, se usó el pico de la especie de 5'-fosfato para la cuantificación. Las tasas de escisión se determinaron midiendo la cantidad de ARN de longitud completa que queda en las mezclas de reacción por HPLC de fase inversa. Las reacciones se inactivan en momentos de tiempo fijos por Na<sub>2</sub>EDTA 30 mM.

Figura 26. Comparación de mapas de escisión de secuencias que contienen un Rp con cambio de posición a partir del extremo 3' de ADN. Estas secuencias se dirigen a la misma región en ARNm de FOXO1. Los mapas de escisión derivan de las mezclas de reacción obtenidas después de 5 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las flechas indican sitios de escisión. (⊥) indica que se identificaron ambos fragmentos, la especie de 5'-fosfato así como la especie de 5'-OH 3'-OH, en mezclas de reacción. (⊥) indica que solo se detectó la especie de 5'-fosfato y (⊥) indica que el componente de 5'-OH 3'-OH se detectó en el análisis de espectrometría de masas. La longitud de la flecha significa la cantidad de metabolito presente en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento. Solo en el caso donde no se detectó 5'-OH 3'-OH en la mezcla de reacción, se usó el pico de la especie de 5'-fosfato para la cuantificación.

Figura 27. (A) Comparación de las tasas de escisión de RNasa H para oligonucleótidos estereopuros (ONT-406), (ONT-401), (ONT-404) y (ONT-408). Las cuatro secuencias son fosforotioatos estereopuros con un enlace Rp. Estas secuencias se dirigen a la misma región en ARNm de FOXO1. Todos los dúplex se incubaron con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las reacciones se inactivaron en momentos de tiempo fijos por Na<sub>2</sub>EDTA 30 mM. Las tasas de escisión se determinaron midiendo la cantidad de ARN de longitud completa que queda en las mezclas de reacción por HPLC de fase inversa. Se encontró que ONT-406 y ONT-401 tenían tasas de escisión superiores. (B) Correlación entre el % de ARN escindido

en el ensayo de RNasa H (oligonucleótido 10  $\mu$ M) y el % de atenuación de ARNm en el ensayo *in vitro* (oligonucleótido 20 nM). Todas las secuencias se dirigen a la misma región de ARNm en la diana FOXO1. La cantidad de ARN que queda se determina por el área de picos de UV para el ARN cuando se normaliza con ADN en la misma mezcla de reacción. Todos los mapas anteriores derivan de la mezcla de reacción obtenida después de 5 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Todas las secuencias de ONT-396 a ONT-414 tienen un fosforotioato Rp y varían en la posición de Rp. El fosforotioato ONT-421 (todos Sp) fue inactivo en el ensayo *in vitro*. Se refiere una mala tasa de escisión de ARN en el ensayo de RNasa H cuando ONT-421 se duplexa con ARN complementario.

*Figura 28.* Ensayo de estabilidad en suero de ADN de PS de paso Rp único (ONT-396-ONT-414), ADN de PS estereoealeatorio (ONT-367), ADN de PS Todo-Sp (ONT-421) y ADN de PS Todo-Rp (ONT-455) en suero de rata durante 2 días. Obsérvese que ONT-396 y ONT-455 se descomponen en el momento de tiempo probado.

*Figura 29.* Oligonucleótidos a modo de ejemplo que incluyen hemímeros. (A): Mapas de escisión. (B): Ensayo de escisión de ARN. (C): Atenuación de ARNm de FOXO1. En algunas realizaciones, la introducción de modificaciones en 2' en el extremo 5' de las secuencias aumenta la estabilidad para unirse a ARN diana mientras se mantiene la actividad de RNasa H. ONT-367 (ADN de fosforotioato estereoealeatorio) y ONT-440 (5-15, 2'-F-ADN) tienen mapas de escisión similares y tasa de escisión de ARN similar en el ensayo de RNasa H (oligonucleótido 10  $\mu$ M). En algunas realizaciones, la secuencia de ONT-440 (5-11, 2'-F-ADN) puede tener mejores propiedades de penetración celular. En algunas realizaciones, las modificaciones en 2' asimétricas proporcionan la ventaja de Tm, mientras se mantiene la actividad de RNasa H. La introducción de motivos de RSS puede potenciar aún más la eficiencia de RNasa H en los hemímeros. Los mapas de escisión derivan de las mezclas de reacción obtenidas después de 5 minutos de incubación de dúplex respectivos con RNasa H1C en presencia de 1X tampón PBS a 37 °C. Las flechas indican sitios de escisión. (⊥) indica que se identificaron ambos fragmentos, la especie de 5'-fosfato así como la especie de 5'-OH 3'-OH, en mezclas de reacción. (⌊) indica que solo se detectó la especie de 5'-fosfato y (⊥) indica que el componente de 5'-OH 3'-OH se detectó en el análisis de espectrometría de masas. La longitud de la flecha significa la cantidad de metabolito presente en la mezcla de reacción que se determinó a partir de la relación entre el área de picos de UV y el coeficiente de extinción teórico de ese fragmento. Solo en el caso donde 5'-OH 3'-OH no se detectó en la mezcla de reacción, se usó el pico de la especie de 5'-fosfato para la cuantificación.

*Figura 30.* Datos de espectrometría de masas a modo de ejemplo del ensayo de escisión. Arriba: Datos para ONT-367: 2,35 min: 7mero; 3,16 min: 8mero y P-6mero; 4,58 min: P-7mero; 5,91 min: P-8mero; 7,19 min: 12mero; 9,55 min: 13mero; 10,13 min: P-11mero; 11,14 min: P-12mero y 14mero; 12,11 min: P-13mero; 13,29 min: P-14mero; 14,80 min: ARN de longitud completa (ONT-388) y 18,33 min: ADN estereoealeatorio (ONT-367). Abajo: Datos para ONT-406: 4,72 min: p-rArUrGrGrCrUrA, ARN 7mero 5'-fosforilado; 9,46 min: 5'-rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrA (SEQ ID NO: 8), ARN 13mero de 5'-OH 3'-OH; 16,45 min: ARN de longitud completa (ONT-388); 19,48 y 19,49 min: ADN estereopuro (ONT-406).

## Descripción detallada de ciertas realizaciones

Los oligonucleótidos sintéticos proporcionan herramientas moleculares útiles en una amplia variedad de aplicaciones. Por ejemplo, los oligonucleótidos son útiles en aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, de investigación y de nuevos nanomateriales. El uso de ácidos nucleicos naturales (por ejemplo, ADN o ARN no modificados) está limitado, por ejemplo, por su susceptibilidad a endo- y exo-nucleasas. Por ello, se han desarrollado diversos homólogos sintéticos para evitar estas limitaciones. Estos incluyen oligonucleótidos sintéticos que contienen modificaciones del esqueleto, que hacen que estas moléculas sean menos susceptibles a la degradación. Desde un punto de vista estructural, dichas modificaciones a los enlaces fosfato internucleotídicos introducen quiralidad. Ha quedado claro que ciertas propiedades de los oligonucleótidos pueden ser afectadas por las configuraciones de los átomos de fósforo que forman el esqueleto de los oligonucleótidos. Por ejemplo, estudios *in vitro* han mostrado que las propiedades de los nucleótidos antisentido, tales como la afinidad de unión, la unión específica de secuencia al ARN complementario, la estabilidad a nucleasas, están afectados por, entre otras cosas, la quiralidad del esqueleto (por ejemplo, las configuraciones de los átomos de fósforo).

Entre otras cosas, la presente invención engloba el reconocimiento de que las preparaciones de oligonucleótidos estereoealeatorios contienen una pluralidad de entidades químicas distintas que se diferencian entre sí en la estructura estereoquímica de los centros quirales individuales del esqueleto dentro de la cadena de oligonucleótidos. Además, la presente invención engloba el conocimiento de que es normalmente poco probable que una preparación de oligonucleótidos estereoealeatorios incluya cada estereoisómero posible del oligonucleótido relevante. Por lo tanto, entre otras cosas, la presente invención proporciona nuevas entidades químicas que son estereoisómeros particulares de oligonucleótidos de interés. Es decir, la presente invención proporciona preparaciones sustancialmente puras de compuestos de un solo oligonucleótido, donde un compuesto de oligonucleótido particular se define por su secuencia de bases, su longitud, su patrón de enlaces del esqueleto y su patrón de centros quirales del esqueleto.



La presente invención demuestra, entre otras cosas, que los estereoisómeros individuales de un oligonucleótido particular pueden mostrar diferente estabilidad y/o actividad entre sí. Además, la presente divulgación demuestra que las mejoras en la estabilidad logradas mediante la inclusión y/o la localización de estructuras quirales particulares dentro de un oligonucleótido pueden ser comparables, o incluso mejores, a las logradas mediante el uso de enlaces del esqueleto, bases y/o azúcares modificados (por ejemplo, mediante el uso de ciertos tipos de fosfatos modificados, modificaciones en 2', modificaciones de bases, etc.). La presente divulgación, en algunas realizaciones, también demuestra que las mejoras de la actividad logradas mediante la inclusión y/o la localización de estructuras quirales particulares dentro de un oligonucleótido pueden ser comparables, o incluso mejores, a las logradas mediante el uso de enlaces del esqueleto, bases y/o azúcares modificados (por ejemplo, mediante el uso de ciertos tipos de fosfatos modificados, modificaciones en 2', modificaciones de bases, etc.). En algunas realizaciones, la inclusión y/o la localización de enlaces quirales particulares dentro de un oligonucleótido pueden cambiar sorprendentemente el patrón de escisión de un polímero de ácido nucleico cuando dicho oligonucleótido se utiliza para la escisión de dicho polímero de ácido nucleico. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona inesperadamente alta eficiencia de escisión de un polímero de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona nuevos sitios de escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona menos sitios de escisión, por ejemplo, bloqueando ciertos sitios de escisión existentes. Incluso más inesperadamente, en algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona escisión en solo un sitio de un polímero de ácido nucleico diana dentro de la secuencia que es complementaria a un oligonucleótido utilizado para la escisión. En algunas realizaciones, se logra mayor eficiencia de escisión seleccionando un patrón de centros quirales del esqueleto para minimizar el número de sitios de escisión.

La presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados (y/o estereoquímicamente puros) que comprenden oligonucleótidos definidos por tener:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. Un patrón de centros quirales del esqueleto de un oligonucleótido se puede designar por una combinación de estereoquímica del fósforo del enlace (*Rp/Sp*) de 5' a 3'. Por ejemplo, como se ejemplifica a continuación, ONT-154 tiene un patrón de 5S-(SSR)<sub>3</sub>-5S y ONT-80 tiene S<sub>19</sub>.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de oligonucleótidos en la que la composición está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de los mismos oligonucleótidos, en oligonucleótidos de un único tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de oligonucleótidos en la que la composición está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de los mismos oligonucleótidos, en oligonucleótidos de un único tipo de oligonucleótido que comparten:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto.

En algunas realizaciones, en una preparación de oligonucleótidos sustancialmente racémica (o quiralmente no controlada), todas o la mayoría de las etapas de acoplamiento no están controladas quiralmente, en la que las etapas de acoplamiento no se realizan específicamente para proporcionar estereoselectividad potenciada. Una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos a modo de ejemplo es la preparación de oligonucleótidos de fosforotioato mediante triésteres de fosfito sulfurizantes con cualquiera de disulfuro de tetraetiltiuram o (TETD) o 1,1-dióxido de 3H-1, 2-bensoditiol-3-ona (BDTD), un proceso bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos proporciona composiciones de oligonucleótidos sustancialmente racémicos (o composiciones de oligonucleótidos quiralmente no controlados).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizado por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y



de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 40 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 60 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 70 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 80 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 90 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 92 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 94 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 95 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 96 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 97 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 98 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 99 % de los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados son del mismo tipo de oligonucleótido.

En algunas realizaciones, la pureza de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados se puede controlar por estereoselectividad de cada etapa de acoplamiento en su proceso de preparación. En algunas realizaciones, una etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad (por ejemplo, diaestereoselectividad) del 60 % (el 60 % del nuevo enlace internucleotídico formado a partir de la etapa de acoplamiento tiene la estereoquímica prevista). Después de dicha etapa de acoplamiento, se puede denominar que el nuevo enlace internucleotídico formado tiene una pureza del 60 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 60 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 70 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 80 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 85 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 90 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 91 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 92 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 93 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 94 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 95 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 96 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 97 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 98 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 99 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de al menos el 99,5 %. En algunas realizaciones, cada etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de prácticamente 100 %. En algunas realizaciones, una etapa de acoplamiento tiene una estereoselectividad de prácticamente el 100 % en la que todo el producto detectable de la etapa de acoplamiento por un método analítico (por ejemplo, RMN, HPLC, etc.) tiene la estereoselectividad prevista.

En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, quiromersen). En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son oligonucleótidos de ARNip. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada es de oligonucleótidos que pueden ser oligonucleótido antisentido, antagonir, microARN, pre-microARN, antimir, supermir, ribozima, adaptador de UI, activador de ARN, agente de iARN, oligonucleótido señuelo, oligonucleótido formador de tríplex, aptámero o adyuvante. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos antisentido. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de antagonir. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de microARN. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de pre-microARN. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos antimir. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos supermir. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de ribozima. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de adaptadores de UI. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de activadores de ARN. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de agente de iARN. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de

oligonucleótidos señuelo. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos formadores de tríplex. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de aptámero. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es de oligonucleótidos de adyuvante.

5 Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que incluyen uno o más enlaces del esqueleto, bases y/o azúcares modificados.

10 Un oligonucleótido proporcionado puede comprender uno o más enlaces fosfato modificados quirales. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender dos o más enlaces fosfato modificados quirales. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender tres o más enlaces fosfato modificados quirales. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender cuatro o más enlaces fosfato modificados quirales. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender cinco o más enlaces fosfato modificados quirales. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 enlaces fosfato modificados quirales.

15 Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 5 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 6 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 7 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 8 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 9 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 10 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 11 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 12 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 13 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 14 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 15 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 16 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 17 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 18 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 19 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 20 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 21 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 22 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 23 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 24 o más enlaces fosfato modificados quirales. Un tipo de oligonucleótido proporcionado puede comprender 25 o más enlaces fosfato modificados quirales.

20 Un oligonucleótido proporcionado puede comprender al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de enlaces fosfato modificados quirales. A modo de ejemplo, dichos enlaces fosfato modificados quirales son como se han descrito anteriormente y en el presente documento. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de enlaces fosfato modificados quirales en la configuración Sp.

25 En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 90 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 91 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 92 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 93 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 94 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 95 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 96 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 97 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 98 %. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son de una pureza estereoquímica superior a aproximadamente el 99 %.

30 Un enlace fosfato modificado quiral puede ser un enlace fosforotioato quiral, es decir, enlace internucleotídico de fosforotioato. Un oligonucleótido proporcionado puede comprender al menos 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de enlaces fosfato modificados quirales en la configuración Sp.



bases modificadas. A modo de ejemplo, dichas bases modificadas son como se han descrito anteriormente y en el presente documento.

5 Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 8 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 9 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 10 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 11 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 12 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 13 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 14 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 15 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 16 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 17 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 18 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 19 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 20 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 21 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 22 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 23 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 24 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 25 bases. Las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas pueden ser de oligonucleótidos que tienen una secuencia de bases común de al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 bases. Según la invención, la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen una secuencia de bases y longitud comunes, un patrón común de enlaces del esqueleto y un patrón común de centros quirales del esqueleto, comprende un único oligonucleótido en donde la secuencia de bases común tiene al menos 15 bases.

45 En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas comprenden oligonucleótidos que contienen uno o más restos que se modifican en el resto de azúcar. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas comprenden oligonucleótidos que contienen uno o más restos que se modifican en la posición 2' del resto de azúcar (denominado en el presente documento una "modificación en 2'"). A modo de ejemplo, dichas modificaciones son como se han descrito anteriormente y en el presente documento e incluyen, pero no se limitan a, 2'-OMe, 2'-MOE, 2'-LNA, 2'-F, etc. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas comprenden oligonucleótidos que contienen uno o más restos que están modificados en 2'. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados contienen uno o más restos que son restos modificados con 2'-O-metoxietilo (2'-MOE). En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas comprenden oligonucleótidos que no contienen modificaciones en 2'. En algunas realizaciones, las preparaciones quiralmente controladas (y/o estereoquímicamente puras) proporcionadas son oligonucleótidos que no contienen restos 2'-MOE. Es decir, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados no están modificados con MOE.

60 Los oligonucleótidos quiralmente controlados (y/o estereoquímicamente puros) proporcionados pueden ser de un motivo general de ala-núcleo-ala (también representado en el presente documento, en general, como X-Y-X). Cada ala puede contener uno o más restos que tienen una modificación particular, modificación que está ausente de la porción de núcleo "Y". Cada ala puede contener uno o más restos que tienen una modificación en 2' que no está presente en la porción de núcleo. Por ejemplo, los oligonucleótidos quiralmente controlados (y/o estereoquímicamente puros) proporcionados pueden tener un motivo ala-núcleo-ala representado como X-Y-X, en donde los restos en cada porción "X" son restos modificados en 2' de un tipo particular y los restos en la porción de núcleo "Y" no son restos modificados en 2' del mismo tipo particular. Por ejemplo, los oligonucleótidos quiralmente controlados (y/o

estereoquímicamente puros) proporcionados pueden tener un motivo ala-núcleo-ala representado como X-Y-X, en donde los restos en cada porción "X" son restos modificados con 2'-MOE y los restos en la porción de núcleo "Y" no son restos modificados con 2'-MOE. Los oligonucleótidos quiralmemente controlados (y/o estereoquímicamente puros) proporcionados puede tener un motivo ala-núcleo-ala representado como X-Y-X, en donde los restos en cada porción "X" son restos modificados con 2'-MOE y los restos en la porción de núcleo "Y" son 2'-desoxirribonucleótido. Un experto en las técnicas relevantes reconocerá que todas esas modificaciones en 2' descritas anteriormente y en el presente documento se contemplan en el contexto de dichos motivos X-Y-X.

Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de una o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de dos o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de tres o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de cuatro o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de cinco o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de seis o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de siete o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de ocho o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de nueve o más bases. Cada región de ala puede tener independientemente una longitud de diez o más bases. Cada región de ala puede tener una longitud de una base. Cada región de ala puede tener una longitud de dos bases. Cada región de ala puede tener una longitud de tres bases. Cada región de ala puede tener una longitud de cuatro bases. Cada región de ala puede tener una longitud de cinco bases.

Una región de núcleo puede tener una longitud de una o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de dos o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de tres o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de cuatro o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de cinco o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de seis o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de siete o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de ocho o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de nueve o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de diez o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de diez bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 3 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 4 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 5 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 6 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 7 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 8 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 9 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 10 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 11 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 12 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 13 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 14 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 15 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 16 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 17 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 18 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 19 bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 11 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 12 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 13 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 14 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 15 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 16 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 17 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 18 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 19 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud de 20 o más bases. Una región de núcleo puede tener una longitud superior a 20 bases. Según la invención, en la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados, la composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen una secuencia de bases y longitud comunes, un patrón común de enlaces del esqueleto y un patrón común de centros quirales del esqueleto, el único oligonucleótido tiene una estructura de ala-núcleo-ala, en donde la primera región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases, y la región de núcleo tiene una longitud de seis o más bases.

En algunas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala (es decir, X-Y-X) de un oligonucleótido proporcionado se representa numéricamente como, por ejemplo, 5-10-5, que significa que cada región de ala del oligonucleótido tiene 5 bases de longitud y la región de núcleo del oligonucleótido tiene 10 bases de longitud. En algunas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es cualquiera de, por ejemplo 2-16-2, 3-14-3, 4-12-4, 5-10-5, etc. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es 5-10-5.

Los enlaces internucleosídicos de oligonucleótidos proporcionados de dichos motivos de ala-núcleo-ala (es decir, X-Y-X) puede ser todos enlaces fosfato modificados quirales. Los enlaces internucleosídicos de oligonucleótidos proporcionados de dichos motivos ala-núcleo-ala (es decir, X-Y-X) puede ser todos enlaces internucleotídicos de fosforotioato quirales. Los enlaces nucleotídicos quirales de oligonucleótidos proporcionados de dichos motivos de ala-núcleo-ala puede ser al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 50, 70, 80 o 90 % de enlaces internucleotídicos de fosfato modificados quirales. Los enlaces nucleotídicos quirales de oligonucleótidos proporcionados de dichos motivos de ala-núcleo-ala puede ser al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 % de los enlaces internucleotídicos de fosforotioato quirales. Los enlaces nucleotídicos quirales de oligonucleótidos proporcionados de dichos motivos de ala-núcleo-ala puede ser al menos aproximadamente el 10, 20, 30, 40, 50, 50, 70, 80 o 90 % de los enlaces internucleotídicos de fosforotioato quirales de la conformación Sp.

En algunas realizaciones, cada región de ala de un motivo ala-núcleo-ala contiene opcionalmente enlaces internucleotídicos de fosfato modificados quirales. En algunas realizaciones, cada región de ala de un motivo ala-núcleo-ala contiene opcionalmente enlaces internucleotídicos de fosforotioato quirales. En algunas realizaciones, cada región de ala de un motivo ala-núcleo-ala contiene enlaces internucleotídicos de fosforotioato quirales. En algunas realizaciones, las dos regiones de ala de un motivo ala-núcleo-ala tienen la misma estereoquímica de enlace internucleotídico. En algunas realizaciones, las dos regiones de ala tienen diferente estereoquímica de enlace internucleotídico. En algunas realizaciones, cada enlace internucleotídico en las alas es independientemente un enlace internucleotídico quiral.

En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala contiene opcionalmente enlaces internucleotídicos de fosfato modificados quirales. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala contiene opcionalmente enlaces internucleotídicos de fosforotioato quirales. Según la invención, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico. Según la invención, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es  $(Sp)_mRp$  o  $Rp(Sp)_m$ , en donde  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es  $(Sp)_mRp$  o  $Rp(Sp)_m$ , en donde  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es  $(Sp)_mRp$ , en donde  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es  $Rp(Sp)_m$ , en donde  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. La región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala puede tener un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es un motivo que comprende al menos 33 % de enlace internucleotídico en la conformación S. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es un motivo que comprende al menos 50 % de enlace internucleotídico en la conformación S. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es un motivo que comprende al menos 66 % de enlace internucleotídico en la conformación S. En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es un motivo triplete repetido seleccionado de  $RpRpSp$  y  $SpSpRp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es una repetición  $RpRpSp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala tiene un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, en donde el patrón repetido es una repetición  $SpSpRp$ .

La presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $(Sp)_mRp$  o  $Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $(Sp)_mRp$ . En algunas realizaciones,  $m$  es 2. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $(Rp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $RpSpRp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $SpRpRp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende  $(Sp)_2Rp$ .

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende  $(Sp)_mRp$  o  $Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende  $Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende



(Sp)<sub>m</sub>Rp. En algunas realizaciones, m es 2. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende Rp(Sp)<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Sp)<sub>2</sub>Rp(Sp)<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Rp)<sub>2</sub>Rp(Sp)<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende RpSpRp(Sp)<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende SpRpRp(Sp)<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Sp)<sub>2</sub>Rp.

15 Como se define en el presente documento, m es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, m es 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, m es 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, m es 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, m es 6, 7 u 8. En algunas realizaciones, m es 7 u 8. En algunas realizaciones, m es 2. En algunas realizaciones, m es 3. En algunas realizaciones, m es 4. En algunas realizaciones, m es 5. En algunas realizaciones, m es 6. En algunas realizaciones, m es 7. En algunas realizaciones, m es 8.

20 Un patrón de repetición puede ser (Sp)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>, en donde n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y m es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Sp)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>. La presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende (Sp)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>. Un patrón de repetición puede ser (Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>, en donde n es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y m es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. Según la invención, n es 1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>. La presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende (Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>. En algunas realizaciones, (Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub> es (Rp)(Sp)<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, (Sp)<sub>n</sub>(Rp)<sub>m</sub> es (Sp)<sub>2</sub>(Rp).

35 En algunas realizaciones, un patrón de repetición es (Sp)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>t</sub>, en donde cada uno de n y t es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y m es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Sp)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>t</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende (Sp)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>t</sub>. En algunas realizaciones, un patrón de repetición es (Sp)<sub>t</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>, en donde cada uno de n y t es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, y m es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Sp)<sub>t</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende (Sp)<sub>t</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>.

50 En algunas realizaciones, un patrón de repetición es (Np)<sub>t</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>, en donde cada uno de n y t es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, Np es independientemente Rp o Sp, y m es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. Según la invención, n es 1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Np)<sub>t</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende (Np)<sub>t</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>m</sub>. En algunas realizaciones, un patrón de repetición es (Np)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>t</sub>, en donde cada uno de n y t es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8, Np es independientemente Rp o Sp, y m es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. Según la invención, n es 1. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto comprende (Np)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>t</sub>. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido cuyo patrón de centros quirales del esqueleto en la región de núcleo comprende (Np)<sub>m</sub>(Rp)<sub>n</sub>(Sp)<sub>t</sub>. En algunas realizaciones, Np es Rp. En algunas realizaciones, Np es Sp. En algunas realizaciones, todos los Np son los mismos. En algunas realizaciones, todos los Np son Sp. En algunas realizaciones, al menos un Np es diferente del otro Np. En algunas realizaciones, t es 2.

65

Como se define en el presente documento,  $n$  pueden ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.  $n$  pueden ser 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.  $n$  pueden ser 3, 4, 5, 6, 7 u 8.  $n$  pueden ser 4, 5, 6, 7 u 8.  $n$  pueden ser 5, 6, 7 u 8.  $n$  pueden ser 6, 7 u 8.  $n$  pueden ser 7 u 8. Según la invención,  $n$  es 1.

5 Como se define en el presente documento,  $t$  es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 3, 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 4, 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 5, 6, 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 6, 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 7 u 8. En algunas realizaciones,  $t$  es 1. En algunas realizaciones,  $t$  es 2. En algunas realizaciones,  $t$  es 3. En algunas realizaciones,  $t$  es 4. En algunas realizaciones,  $t$  es 5. En algunas realizaciones,  $t$  es 6. En algunas realizaciones,  $t$  es 7. En algunas realizaciones,  $t$  es 8.

10 En algunas realizaciones, al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 2. En algunas realizaciones, al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 3. En algunas realizaciones, al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 4. En algunas realizaciones, al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 5. En algunas realizaciones, al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 6. En algunas realizaciones, al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 7. En algunas realizaciones, cada uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 2. En algunas realizaciones, cada uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 3. En algunas realizaciones, cada uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 4. En algunas realizaciones, cada uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 5. En algunas realizaciones, cada uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 6. En algunas realizaciones, cada uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 7.

20 Según la invención,  $n$  es 1, y al menos uno de  $m$  y  $t$  es mayor que 1. En algunas realizaciones,  $n$  es 1 y cada uno de  $m$  y  $t$  es independiente y superior a 1. En algunas realizaciones,  $m > n$  y  $t > n$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $SpRp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones,  $(Rp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Rp)_2Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones,  $(Rp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Rp)_2Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones,  $(Rp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Rp)_2Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones,  $(Rp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Rp)_2Rp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones,  $(Rp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $SpRpRp(Sp)_m$ . En algunas realizaciones,  $(Rp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $SpRpRp(Sp)_m$ .

25 En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $SpRpSpSp$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_3Rp(Sp)_3$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_4Rp(Sp)_4$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_tRp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $SpRp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_2Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_3Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_4Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  es  $(Sp)_5Rp(Sp)_5$ .

30 En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_3Rp(Sp)_3$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_4Rp(Sp)_4$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_mRp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_2Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_3Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_4Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones,  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  es  $(Sp)_5Rp(Sp)_5$ .

35 Según la invención, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos un enlace internucleotídico  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos un enlace internucleotídico de fosforotioato  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos dos enlaces internucleotídicos  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos dos enlaces internucleotídicos de fosforotioato  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos tres enlaces internucleotídicos  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos tres enlaces internucleotídicos de fosforotioato  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 enlaces internucleotídicos  $Rp$ . En algunas realizaciones, la región de núcleo de un motivo ala-núcleo-ala comprende al menos 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 enlaces internucleotídicos de fosforotioato  $Rp$ .

40 En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde los restos en cada región de ala "X" son restos modificados con 2'-MOE. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde los restos en la región de núcleo "Y" son restos de 2'-desoxirribonucleótido. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde todos los enlaces internucleosídicos son enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde todos los enlaces internucleosídicos son enlaces internucleosídicos de fosforotioato quiral. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde los restos en cada región de ala "X" son restos modificados con 2'-MOE, los restos en la región de núcleo "Y" son 2'-desoxirribonucleótido, y todos los enlaces internucleosídicos son enlaces internucleosídicos de fosforotioato quiral.

55 En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde los restos en cada región de ala "X" no son restos modificados con 2'-MOE. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde los restos en la región de núcleo "Y" son restos de 2'-desoxirribonucleótidos. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde todos los enlaces internucleosídicos son enlaces internucleosídicos de fosforotioato. En ciertas realizaciones, un motivo ala-núcleo-ala es un motivo 5-10-5, en donde todos los enlaces





En algunas realizaciones, al menos 20 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico es fosfato. En algunas realizaciones, dos enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, tres enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, cuatro enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, cinco enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, seis enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, siete enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, ocho enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, nueve enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 10 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 11 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 12 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 13 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 14 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 15 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 16 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 17 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 18 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 19 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, 20 enlaces internucleotídicos son fosfato. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido de una composición proporcionada comprende una región en la que todos los enlaces internucleotídicos, excepto el al menos uno del primer, segundo, tercero, quinto, séptimo, octavo, noveno, decimoctavo, decimonoveno y vigésimo enlaces internucleotídicos que es quiral, son fosfato.

En algunas realizaciones, un único oligonucleótido de una composición proporcionada comprende una región en la que al menos uno del primer, segundo, tercero, quinto, séptimo, octavo, noveno, decimoctavo, decimonoveno y vigésimo enlaces internucleotídicos son quirales, y al menos el 10 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región es aquiral. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido de una composición proporcionada comprende una región en la que al menos uno del primer, segundo, tercero, quinto, séptimo, decimoctavo, decimonoveno y vigésimo enlaces internucleotídicos es quiral, y al menos el 10 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 20 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 30 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 40 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 50 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 60 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 70 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 80 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 90 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, al menos el 50 % de todos los enlaces internucleotídicos en la región son aquirales. En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico aquiral es un enlace fosfato. En algunas realizaciones, cada enlace internucleotídico aquiral es un enlace fosfato.

En algunas realizaciones, el primer enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el primer enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el segundo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el segundo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el tercer enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el tercer enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el quinto enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el quinto enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el séptimo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el séptimo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el octavo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el octavo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el noveno enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el noveno enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el decimoctavo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el decimoctavo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el decimonoveno enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el decimonoveno enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp. En algunas realizaciones, el vigésimo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Sp. En algunas realizaciones, el vigésimo enlace internucleotídico de la región es un enlace internucleotídico modificado Rp.

En algunas realizaciones, la región tiene una longitud de al menos 21 bases. En algunas realizaciones, la región tiene una longitud de 21 bases. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene una longitud de al menos 21 bases. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene una longitud de 21 bases.

En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico quiral tiene la estructura de la fórmula I. En algunas realizaciones, un enlace internucleotídico quiral es fosforotioato. En algunas realizaciones, cada enlace internucleotídico quiral en un único oligonucleótido de una composición proporcionada tiene independientemente la estructura de la fórmula I. En

algunas realizaciones, cada enlace internucleotídico quiral en un único oligonucleótido de una composición proporcionada es un fosforioato.

5 Como conoce un experto habitual en la técnica y se describe en la divulgación, se pueden introducir diversas modificaciones en la posición 2' del resto de azúcar. Las modificaciones en 2' comúnmente usadas incluyen, pero no se limitan a, 2'-OR<sup>1</sup>, en donde R<sup>1</sup> no es hidrógeno. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-OR, en donde R es alifático opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-OMe. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-O-MOE. En algunas realizaciones, la presente invención demuestra que la inclusión y/o la localización de enlaces internucleotídicos quiralmente puros particulares puede proporcionar mejoras en la estabilidad comparables a o mejores a las logradas mediante el uso de enlaces del esqueleto, bases y/o azúcares modificados. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido proporcionado de una composición proporcionada no tiene modificaciones en los azúcares. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido proporcionado de una composición proporcionada no tiene modificaciones en las posiciones 2' de los azúcares (es decir, los dos grupos en la posición 2' son cualquiera de -H/-H o -H/-OH). En algunas realizaciones, un único oligonucleótido proporcionado de una composición proporcionada no tiene modificaciones 2'-MOE.

10 En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada es un mejor sustrato para proteínas Argonaute (por ejemplo, hAgo-1 y hAgo-2) en comparación con las composiciones de oligonucleótidos estereoaleatorios. La selección y/o la localización de enlaces quiralmente puros como se describe en la presente divulgación son parámetros de diseño útiles para oligonucleótidos que interactúan con dichas proteínas, tales como ARNip.

15 Un único oligonucleótido en una composición proporcionada puede tener al menos aproximadamente el 25 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. Un único oligonucleótido en una composición proporcionada puede tener al menos aproximadamente el 30 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. Un único oligonucleótido en una composición proporcionada puede tener al menos aproximadamente el 35 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. Según la invención, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 40 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 45 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 50 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 55 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 60 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 65 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 70 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 75 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 80 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 85 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp. En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada tiene al menos aproximadamente el 90 % de sus enlaces internucleotídicos en la configuración Sp.

45 En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada no es un oligonucleótido seleccionado de:



En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada no es un oligonucleótido seleccionado de:





## ES 2 917 473 T3

En algunas realizaciones, un único oligonucleótido en una composición proporcionada no es un oligonucleótido seleccionado de:

ONT-106	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sentido	(SEQ ID NO: 14)
ONT-107	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	PCSK9 sentido	(SEQ ID NO: 15)
ONT-108	(Rp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisentido	(SEQ ID NO: 16)
ONT-109	(Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisentido	(SEQ ID NO: 17)
ONT-110	(Rp, Rp)- asAGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisentido	(SEQ ID NO: 18)
ONT-111	(Sp, Rp)- asGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisentido	(SEQ ID NO: 19)
ONT-112	(Sp, Sp)- asGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisentido	(SEQ ID NO: 20)
ONT-113	(Rp, Sp)- asGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	PCSK9 antisentido	(SEQ ID NO: 21)

5 en donde las minúsculas representan restos de ARN 2'-OME; las mayúsculas representan restos de ARN 2'-OH; y la negrita y "s" indica un resto fosforotioato; y

<b>PCSK9 (1)</b>	(Todo (Sp))- ususcsusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	(SEQ ID NO: 22)
<b>PCSK9 (2)</b>	(Todo (Rp))- ususcsusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	(SEQ ID NO: 23)
<b>PCSK9 (3)</b>	(Todo (Sp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT	(SEQ ID NO: 24)
<b>PCSK9 (4)</b>	(Todo (Rp))- usucuAsGsAsccuGsuuuuGscuusdTsdT	(SEQ ID NO: 25)
<b>PCSK9 (5)</b>	(Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp)- ususcsusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	(SEQ ID NO: 26)
<b>PCSK9 (6)</b>	(Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp)- ususcsusAsGsAscscsusGsusususGscsusudTsdT	(SEQ ID NO: 27)

10 en donde las minúsculas representan restos de ARN 2'-OME; las mayúsculas representan restos de ARN; d = restos 2'-desoxi; y "s" indica un resto fosforotioato; y

ES 2 917 473 T3

<b>PCSK9 (7)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 28)
<b>PCSK9 (8)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- AsAsGscsAsAsAsAscsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 29)
<b>PCSK9 (9)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- AsAGcAAAacsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 30)
<b>PCSK9 (10)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- AsAGcAAAacsAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 31)
<b>PCSK9 (11)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT	(SEQ ID NO: 32)
<b>PCSK9 (12)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- AAsGscsAsAsAsAscAGGUCuAGAAdTsdT	(SEQ ID NO: 33)
<b>PCSK9 (13)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 34)
<b>PCSK9 (14)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- AsAsGscAsAsAsAscAsGsGsUsCsuAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 35)
<b>PCSK9 (15)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 36)
<b>PCSK9 (16)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 37)
<b>PCSK9 (17)</b>	( <i>Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp</i> )- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 38)
<b>PCSK9 (18)</b>	( <i>Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp</i> )- AsAGcAAAsAscAsGsGsUsCsusAsGsAsAsdTsdT	(SEQ ID NO: 39)

en donde las minúsculas representan restos de ARN 2'-OMe; las mayúsculas representan restos de ARN; d = restos 2'-desoxi; "s" indica un resto fosforotioato; y

ES 2 917 473 T3

<b>PCSK9 (19)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- UfsusCfsusAfsagsAfsacsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT	(SEQ ID NO: 40)
<b>PCSK9 (20)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- UfsusCfsusAfsagsAfsacsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT	(SEQ ID NO: 41)
<b>PCSK9 (21)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- UfsuCfsuAfsuAfsuAfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT	(SEQ ID NO: 42)
<b>PCSK9 (22)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- UfsuCfsuAfsuAfsuAfsuGfsuUfsuUfsgCfsuUfsdTsdT	(SEQ ID NO: 43)
<b>PCSK9 (23)</b>	( <i>Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp</i> )- UfsusCfsusAfsagsAfsacsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT	(SEQ ID NO: 44)
<b>PCSK9 (24)</b>	( <i>Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp</i> )- UfsusCfsusAfsagsAfsacsCfsusGfsusUfsusUfsgsCfsusUfsdTsdT	(SEQ ID NO: 45)

5 en donde las minúsculas representan restos de ARN 2'-OMe; las mayúsculas representan restos de ARN 2'-F; d = restos 2'-desoxi; y "s" indica un resto fosforotioato; y

<b>PCSK9 (25)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- asAfsagsCfsasAfsasAfsacsAfsagsGfsusCfsusAfsagsAfsasdTsdT	(SEQ ID NO: 46)
<b>PCSK9 (26)</b>	(Todo ( <i>Sp</i> ))- asAfsagsCfsasAfsasAfsacsAfsagsGfsusCfsusAfsagsAfsasdTsdT	(SEQ ID NO: 47)
<b>PCSK9 (27)</b>	(Todo ( <i>Rp</i> ))- asAfgCfaAfaAfsAfsagsGfsusCfsusAfsagsAfsasdTsdT	(SEQ ID NO: 48)
<b>PCSK9 (28)</b>		(SEQ ID NO: 49)



**Estructuras de oligonucleótidos modificados**

5 Como se observa anteriormente, en vista de la utilidad de las composiciones de oligonucleótidos en diversas aplicaciones e indicaciones, los expertos en la técnica han tratado de desarrollar modificaciones de estructuras de oligonucleótidos que pueden tener características o atributos preferidos o deseables en comparación con las moléculas de oligonucleótidos naturales, por ejemplo como se usa en aplicaciones e indicaciones particulares. A modo de ejemplo, dichas modificaciones se describen a continuación.

10 El documento de patente WO2010/141471 (en el presente documento "Traversa I") enseña la modificación de diferentes tipos de construcciones de ácido nucleico modificadas para tener una carga polianiónica neta reducida. El documento de patente WO2010/039543 (en el presente documento "Travera II") enseña composiciones y métodos de preparación de polinucleótidos neutros (NN) con carga polianiónica reducida. El documento de patente  
15 WO2008/008476 (en el presente documento "Traversa III") describe la síntesis de profármacos de fosfato de SATE (tipo Imbach). Traversa I, II y III no enseñan oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

El documento de patente WO2010/072831 (en el presente documento "Girindus et al.") también enseña la modificación de oligonucleótidos. En particular, Girindus et al. enseñan el uso de reactivos de sulfurización para generar triésteres de fosforotioato como profármacos. Girindus et al. no enseñan oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

25 Similarmente, el documento de patente WO2004/085454 (en el presente documento "Avecia I") enseña la preparación de oligonucleótidos de fosforotioato mediante, por ejemplo, sillación transitoria de diésteres de poli-*H*-fosfonato. El documento de patente WO2001/027126 (en el presente documento "Avecia II") enseña procesos para la síntesis en fase sólida de oligonucleótidos de fosfotriéster acoplado monómeros de *H*-fosfonato con un oligonucleótido de 5'-hidroxilo soportado sólido y sulfurización adicional del diéster de *H*-fosfonato resultante en un triéster de fosforotioato. La divulgación del documento de patente WO2001/064702 (en el presente documento "Avecia III") es similar a Avecia  
30 II y describe además la síntesis en fase sólida sobre diferentes soportes sólidos. Avecia I, II y III no enseñan oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

El documento de patente WO1997/006183 (en el presente documento "Chiron") enseña oligonucleótidos con enlaces internucleotídicos catiónicos que comprenden fósforo asimétrico, tal como amidatos estereopuros. Chiron enseña oligonucleótidos estereopuros obtenidos por cristalización de una mezcla de diaestereómeros o por resolución usando, por ejemplo, cromatografía en columna. Chiron no enseña oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

40 El documento de patente WO2009/146123 (en el presente documento "Spring Bank I") enseña composiciones y métodos de tratamiento de infecciones víricas usando oligonucleótidos de fosfato sustituidos y triésteres de fosforotioato. El documento de patente WO2007/070598 (en el presente documento "Spring Bank II") enseña profármacos de fosfotriéster como ácidos nucleicos antivíricos y enseña la síntesis de profármacos de fosforotioato. Spring Bank I y II no enseñan oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de  
45 preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

El documento de patente EP0779893 (en el presente documento "Hybridon") enseña profármacos lipófilos para el aumento de la captación celular de oligonucleótidos antisentido y observa que los fosforotioatos Rp y Sp y los dímeros de triésteres de fosforotioato pueden tener diferentes propiedades de estabilidad enzimática. Hybridon no enseña oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

55 El documento de patente WO1997/047637 (en el presente documento "Imbach I") enseña, en general, las composiciones de oligonucleótidos de profármaco Imbach "SATE" (S-acil tioetilo) y métodos. Imbach I describe, por ejemplo, profármacos de fosfotriéster biorreversibles y la preparación de ciertos oligonucleótidos de profármaco usando alquilación post-sintética o fosforamiditos que contienen grupo de profármaco. El documento de patente US 6.124.445 (en el presente documento "Imbach II") enseña oligonucleótidos de profármaco antisentido y quiméricos modificados. Imbach I y II no enseñan oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la presente invención.

60 El documento de patente WO2006/065751 (en el presente documento "Beaucage") enseña profármacos de fosforotioato de oligonucleótidos CpG que comprenden sustituyentes termolábiles (cuyos sustituyentes se introducen por un monómero fosforamidito), y aplicaciones de los mismos. Beaucage no enseñan oligonucleótidos quiralmente controlados, composiciones de los mismos, ni métodos de preparación y uso de los mismos, como se describe por la  
65 presente invención.

5 Takeshi Wada et al. desarrollaron novedosos métodos para la síntesis estereocontrolada de ácidos nucleicos P-quirales usando auxiliares quirales de amidito (documentos de patente JP4348077, WO2005/014609, WO2005/092909 y WO2010/064146, denominados de forma conjunta en el presente documento "Wada I"). En particular, el documento de patente WO2010/064146 (denominado en el presente documento "Wada II") desvela métodos de síntesis de ácidos nucleicos modificados en el átomo de fósforo, en donde la configuración estereoquímica en el fósforo está controlada. Sin embargo, los métodos de Wada II están limitados en que no proporcionan modificación en P individual de cada fósforo del enlace quiral en un modo controlado y diseñado. Es decir, los métodos para los enlaces modificados en P de Wada II proporcionan la generación de una cadena de oligonucleótidos de poli *H*-fosfonato intermedio condensado que, una vez formado hasta una longitud deseada, se modifica en masa en el fósforo del enlace para proporcionar, por ejemplo, un diéster de fosforotioato deseado, fosforamidoato o boranofosfato, u otros ácidos nucleicos modificados con átomos de fósforo (denominada la vía B en el documento - Esquema 6, página 36). Además, las cadenas de oligonucleótidos de *H*-fosfonato de Wada II son de longitudes más cortas (por ejemplo, dímero, trímero o tetrámero). Combinado con el hecho de que no existe etapa de terminación en la vía B, que, en general, presenta baja pureza en bruto como resultado de la acumulación de subproductos de tipo "n-1", la vía de Wada II contiene limitaciones con respecto a la síntesis de oligonucleótidos más largos. Mientras que Wada II contempla, en general, que se pudiera prever un oligonucleótido particular para contener diferentes modificaciones en cada fósforo del enlace, Wada II no describe ni sugiere métodos para la instalación iterativa controlada de dichas modificaciones, como se describe en el presente documento. Hasta el punto que Wada II representa un ciclo sintético que no requiere un oligonucleótido intermedio de *H*-fosfonato para que sea completamente ensamblado antes de la modificación en el fósforo del enlace (denominado en el presente documento la vía A, página 35, Esquema 5, "Síntesis de un ácido nucleico que comprende un resto de X-fosfonato quiral de la fórmula 1 por la vía A"), esta divulgación general no enseña ciertas etapas clave que se requieren para instalar ciertas modificaciones en P, como se proporciona por la presente invención, y especialmente no con ningún grado de eficiencia y versatilidad de forma que este ciclo fuera útil en la síntesis de oligonucleótidos modificados en P quiralmente controlados, y especialmente oligonucleótidos de longitudes mayores.

Al menos dicha ineficiencia de Wada II no es observada por Wada et al. en el documento de patente WO2012/039448 (en el presente documento "Wada III"). Wada III enseña novedosos auxiliares quirales para su uso en los métodos de Wada II para producir oligonucleótidos de *H*-fosfonato que, una vez formados, pueden ser posteriormente modificados para proporcionar, entre otras cosas, fosforotioatos y similares. Wada et al. observan en Wada III que los cuatro tipos de auxiliares quirales desvelados en Wada II formaron fuertes enlaces con el fósforo en el fósforo del enlace y así no permitieron la eficiente retirada. Wada III observa que la retirada de los auxiliares quirales de Wada II requirieron condiciones rigurosas, condiciones que fueron propensas a comprometer la integridad del oligonucleótido producto. Wada III observa que esto es especialmente problemático cuando se sintetizan oligonucleótidos de cadena larga por al menos el motivo que a medida que avanza(n) la(s) reacción (reacciones) de degradación, se generan subproductos adicionales que pueden reaccionar además con el oligonucleótido producto y degradarlo. Wada III proporciona, por lo tanto, auxiliares quirales que pueden ser más eficientemente escindidos del oligonucleótido en condiciones ácidas suaves a modo de un mecanismo  $S_N1$  que libera el enlace internucleotídico de *H*-fosfonato (vía B), o en condiciones básicas relativamente suaves, por una vía de  $\beta$ -eliminación.

Un experto en las técnicas químicas y sintéticas apreciará inmediatamente las complejidades asociadas a generar oligonucleótidos quiralmente controlados, tales como los proporcionados por la presente invención. Por ejemplo, para sintetizar y aislar un oligonucleótido quiralmente controlado, las condiciones para cada adición de monómero deben ser diseñadas de forma que (1) la química sea compatible con cada porción del oligonucleótido en crecimiento; (2) los subproductos generados durante cada adición de monómero no comprometan la integridad estructural y estereoquímica del oligonucleótido en crecimiento; y (3) la composición del producto final en bruto es una composición que permite el aislamiento del producto de oligonucleótido quiralmente controlado deseado.

Los fosforotioatos de oligonucleótido han mostrado potencial terapéutico (Stein et al., Science (1993), 261:1004-12; Agrawal et al., Antisense Res. y Dev. (1992), 2:261-66; Bayever et al., Antisense Res. y Dev. (1993), 3:383-390). Los fosforotioatos de oligonucleótido preparados sin consideración de la estereoquímica del fosforotioato existen como una mezcla de  $2^n$  diaestereómeros, donde  $n$  es el número de enlaces internucleotídicos de fosforotioato. Las propiedades químicas y biológicas de estos fosforotioatos diaestereoméricos pueden ser distintas. Por ejemplo, Wada et al (Nucleic Acids Symposium Series No. 51 p. 119-120; doi:10.1093/nass/nrm060) encontraron que el dúplex estereodefinido-(*Rp*)-(Ups)9U/(Ap)9A mostró un mayor valor de  $T_m$  que el de natural-(Up)9U/(Ap)9A y estereodefinido-(Sp)-(Ups)9U no formó un dúplex. En otro ejemplo, en un estudio por Tang et al., (Nucleosides Nucleotides (1995), 14:985-990) se encontró que los fosforotioatos de *Rp*-oligodesoxirribonucleósidos estereopuros poseían menor estabilidad a las nucleasas endógenas al suero humano que los fosforotioatos de oligodesoxirribonucleósidos parentales con quiralidad de fósforo no definida.

### ***Oligonucleótidos quiralmente controlados y composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados***

La presente invención proporciona oligonucleótidos quiralmente controlados, y composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados que son de elevada pureza en bruto y de elevada pureza diaestereomérica. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos quiralmente controlados, y composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados que son de elevada pureza en bruto. En algunas realizaciones, la presente

invención proporciona oligonucleótidos quiralmemente controlados, y composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados que son de elevada pureza diaestereomérica.

La presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de oligonucleótidos en la que la composición está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de los mismos oligonucleótidos, en oligonucleótidos de un único tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de oligonucleótidos en la que la composición está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de los mismos oligonucleótidos, en oligonucleótidos de un único tipo de oligonucleótido que comparten:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizada por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmemente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular.

En algunas realizaciones, como entiende un experto habitual en la técnica, en una preparación de oligonucleótidos sustancialmente racémicos (o quiralmemente no controlados), todas o la mayoría de las etapas de acoplamiento no están quiralmemente controladas ya que las etapas de acoplamiento no se realizan específicamente para proporcionar estereoselectividad potenciada. Una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos a modo de ejemplo es la preparación de oligonucleótidos de fosforotioato mediante la sulfurización de triésteres de fosfito con o de disulfuro de tetraetiltiuram (TETD) o 1,1-dióxido de 3H-1, 2-bensoditiol-3-ona (BDTD), un proceso bien conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos proporciona composiciones de oligonucleótidos sustancialmente racémicos (o composiciones de oligonucleótidos quiralmemente no controlados).

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados es una preparación sustancialmente pura de un tipo de oligonucleótido en el que los oligonucleótidos en la composición que no son del tipo de oligonucleótido son impurezas del proceso de preparación de dicho tipo de oligonucleótido, en algún caso, después de ciertos procedimientos de purificación.

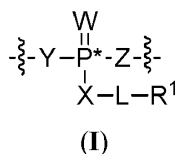
En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos que comprenden uno o más enlaces internucleotídicos diaestereoméricamente puros con respecto al fósforo del enlace quiral. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos que comprenden uno o más enlaces internucleotídicos diaestereoméricamente puros que tienen la estructura de la fórmula I. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos que comprenden uno o más enlaces internucleotídicos diaestereoméricamente puros con respecto al fósforo del enlace quiral, y uno o más enlaces diéster de fosfato. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos que comprenden uno o más enlaces internucleotídicos diaestereoméricamente puros que tienen la estructura de la fórmula I, y uno o más enlaces diéster de fosfato. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona oligonucleótidos que comprenden uno o más enlaces internucleotídicos



5 diaestereoméricamente puros que tienen la estructura de la fórmula I-c, y uno o más enlaces diéster de fosfato. En algunas realizaciones, dichos oligonucleótidos se preparan usando síntesis de oligonucleótidos estereoselectivos, como se describe en la presente solicitud, para formar enlaces internucleotídicos diaestereoméricamente puros previamente diseñados con respecto al fósforo del enlace quiral. Por ejemplo, en un oligonucleótido a modo de ejemplo de (Rp/Sp, Rp/Sp, Rp/Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp)-d[GsCsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsTsCsGs1Cs1As1CsC] (SEQ ID NO: 63), los tres primeros enlaces internucleotídicos se construyen usando el método de síntesis de oligonucleótidos tradicional, y los enlaces internucleotídicos diaestereoméricamente puros se construyen con control estereoquímico como se describe en la presente solicitud. Los enlaces internucleotídicos a modo de ejemplo, que incluye los que tienen estructuras de la fórmula I, se describen adicionalmente a continuación.

15 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferente estereoquímica y/o diferentes modificaciones en P entre sí. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro, y en donde el oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro, y en donde el oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosforotioato. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro, y en donde el oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de triéster de fosforotioato. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro, y en donde el oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos un enlace internucleotídico de triéster de fosforotioato.

35 En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados independientemente que tiene la estructura de la fórmula I:



40 en donde cada variable es como se define y se describe a continuación. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados de la fórmula I, y en donde los enlaces internucleotídicos individuales de la fórmula I dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados de la fórmula I, y en donde los enlaces internucleotídicos individuales de la fórmula I dentro del oligonucleótido tienen diferente -X-L-R<sup>1</sup> el uno con respecto al otro. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados de la fórmula I, y en donde los enlaces internucleotídicos individuales de la fórmula I dentro del oligonucleótido tienen diferentes X el uno con respecto al otro. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados de la fórmula I, y en donde los enlaces internucleotídicos individuales de la fórmula I dentro del oligonucleótido tienen diferente -L-R<sup>1</sup> el uno con respecto al otro.

55 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferente estereoquímica y/o diferentes modificaciones en P el uno con respecto al otro. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferente estereoquímica entre sí, y en donde al menos una porción de la estructura del oligonucleótido quiralmente controlado se caracteriza por un patrón de repetición de estereoquímica alterna.

60 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferentes modificaciones

en P entre sí, que tienen diferentes átomos X en sus restos -XLR<sup>1</sup>, y/o que tienen diferentes grupos L en sus restos -XLR<sup>1</sup>, y/o que tienen diferentes átomos R<sup>1</sup> en sus restos -XLR<sup>1</sup>.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado, en donde al menos dos de los enlaces internucleotídicos individuales dentro del oligonucleótido tienen diferente estereoquímica y/o diferentes modificaciones en P entre sí y el oligonucleótido tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



en donde:

cada R<sup>B</sup> representa independientemente un bloque de unidades de nucleótidos que tienen la configuración R en el fósforo del enlace;

cada S<sup>B</sup> representa independientemente un bloque de unidades de nucleótidos que tienen la configuración S en el fósforo del enlace;

cada uno de n<sub>1</sub>-n<sub>y</sub> es cero o un número entero, con el requisito que al menos un n impar y al menos un n par deben ser distintos de cero, de manera que el oligonucleótido incluya al menos dos enlaces internucleotídicos individuales con diferente estereoquímica el uno con respecto al otro; y

en donde la suma de n<sub>1</sub>-n<sub>y</sub> es entre 2 y 200, y en algunas realizaciones es entre un límite inferior seleccionado del grupo que consiste en 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más y un límite superior seleccionado del grupo que consiste en 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 y 200, siendo el límite superior mayor que el límite inferior.

En algunas de dichas realizaciones, cada n tiene el mismo valor; en algunas realizaciones, cada n par tiene el mismo valor que cada otro n par; en algunas realizaciones, cada n impar tiene el mismo valor que cada otro n impar; en algunas realizaciones, al menos dos n pares tienen diferentes valores entre sí; en algunas realizaciones, al menos dos n impares tienen diferentes valores entre sí.

En algunas realizaciones, al menos dos n adyacentes son iguales entre sí, de manera que un oligonucleótido proporcionado incluye bloques adyacentes de enlaces estereoquímicos S y enlaces estereoquímicos R de longitudes iguales. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados incluyen bloques repetidos de enlaces estereoquímicos S y R de longitudes iguales. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados incluyen bloques repetidos de enlaces estereoquímicos S y R, donde al menos dos de dichos bloques son de diferentes longitudes entre sí; en algunas de dichas realizaciones, cada bloque estereoquímico S es de la misma longitud, y es de una longitud diferente de cada longitud estereoquímica R, que puede ser opcionalmente de la misma longitud que el otro.

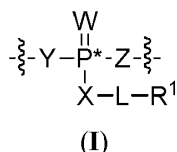
En algunas realizaciones, al menos dos n adyacentes con salto son iguales entre sí, de manera que un oligonucleótido proporcionado incluye al menos dos bloques de enlaces de una primera estereoquímica que son de igual longitud entre sí y se separan por un bloque de enlaces de la otra estereoquímica, bloque de separación que puede ser de la misma longitud o de longitud diferente de los bloques de la primera estereoquímica.

En algunas realizaciones, n asociados a bloques de enlace en los extremos de un oligonucleótido proporcionado son de la misma longitud. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados tienen bloques terminales de la misma estereoquímica de enlace. En algunas de dichas realizaciones, los bloques terminales se separan entre sí por un bloque central de la otra estereoquímica de enlace.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  es un estereoblockmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  es un estereoskipmero. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  es un estereoaltmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  es un gápmero.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  es de cualquiera de los patrones anteriormente descritos y comprende además patrones de modificaciones en P. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  y es un estereoskipmero y skipmero con modificación en P. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  y es un estereoblockmero y altmero con modificación en P. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  y es un estereoaltmero y blockmero con modificación en P.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado de la fórmula  $[S^{Bn1}R^{Bn2}S^{Bn3}R^{Bn4}\dots S^{Bnx}R^{Bny}]$  es un oligonucleótido quiralmemente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados que tiene independientemente la estructura de la fórmula I:



en donde:

$P^*$  es un átomo de fósforo asimétrico y es o  $R_p$  o  $S_p$ ;

W es O, S o Se;

cada uno de X, Y y Z es independientemente -O-, -S-, -N(-L-R<sup>1</sup>)- o L;

L es un enlace covalente o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>- -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>- -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

cada R' es independientemente -R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, o:

dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido, o

dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

-Cy- es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbocicileno, arileno, heteroarileno o heterocicileno;

cada R es independientemente hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbocicilo, arilo, heteroarilo o heterocicilo; y

cada



representa independientemente una conexión a un nucleósido.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende uno o más enlaces internucleotídicos de fósforo modificados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende, por ejemplo, un enlace de fosforotioato o de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende un enlace de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende al menos dos enlaces de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende al menos tres enlaces de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende al menos cuatro enlaces de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende al menos cinco enlaces de triéster de fosforotioato. A modo de ejemplo, dichos enlaces internucleotídicos de fósforo modificados se describen más adelante en el presente documento.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende diferentes enlaces internucleotídicos de fósforo. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos un enlace internucleotídico modificado. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al

menos un enlace de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos dos enlaces de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos tres enlaces de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos cuatro enlaces de triéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos cinco enlaces de triéster de fosforotioato. A modo de ejemplo, dichos enlaces internucleotídicos de fósforo modificados se describen más adelante en el presente documento.

En algunas realizaciones, un enlace de triéster de fosforotioato comprende un auxiliar quiral, que, por ejemplo, se usa para controlar la estereoselectividad de una reacción. En algunas realizaciones, un enlace de triéster de fosforotioato no comprende un auxiliar quiral. En algunas realizaciones, un enlace de triéster de fosforotioato se mantiene intencionadamente hasta que y/o durante la administración a un sujeto.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado está unido a un soporte sólido. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se escinde de un soporte sólido.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos dos enlaces internucleotídicos modificados consecutivos. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos dos enlaces internucleotídicos de triéster de fosforotioato consecutivos.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un blockmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un estereoblockmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un blockmero con modificación en P. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un blockmero de enlace.

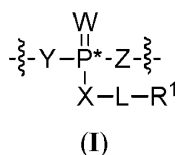
En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un altmero. La presente divulgación también se refiere a un oligonucleótido quiralmente controlado que es un estereoblockmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un altmero con modificación en P. La presente divulgación también se refiere a un oligonucleótido quiralmente controlado que es un altmero de enlace.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un unímero. La presente divulgación también se refiere a un oligonucleótido quiralmente controlado que es un estereounímero. La presente divulgación también se refiere a un oligonucleótido quiralmente controlado que es un estereounímero con modificación en P. La presente divulgación también se refiere a un oligonucleótido quiralmente controlado que es un unímero de enlace.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un gápmero.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado es un skipmero.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados independientemente que tiene la estructura de la fórmula I:



en donde:

P\* es un átomo de fósforo asimétrico y es o Rp o Sp;

W es O, S o Se;

cada uno de X, Y y Z es independientemente -O-, -S-, -N(-L-R<sup>1</sup>)- o L;

L es un enlace covalente o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

cada R' es independientemente -R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, o:

dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido, o

dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

-Cy- es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbocicileno, arileno, heteroarileno o heterocicileno;

cada R es independientemente hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbociclilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo; y

cada



representa independientemente una conexión a un nucleósido.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, P\* es un átomo de fósforo asimétrico y es o Rp o Sp. En algunas realizaciones, P\* es Rp. En otras realizaciones, P\* es Sp. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más enlaces internucleotídicos de la fórmula I en donde cada P\* es independientemente Rp o Sp. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más enlaces internucleotídicos de la fórmula I en donde cada P\* es Rp. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende uno o más enlaces internucleotídicos de la fórmula I en donde cada P\* es Sp. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde P\* es Rp. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde P\* es Sp. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde P\* es Rp, y al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde P\* es Sp.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, W es O, S o Se. En algunas realizaciones, W es O. En algunas realizaciones, W es S. En algunas realizaciones, W es Se. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde W es O. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde W es S. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde W es Se.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, cada R es independientemente hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbociclilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

En algunas realizaciones, R es hidrógeno. En algunas realizaciones, R es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbociclilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

En algunas realizaciones, R es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es hexilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R es pentilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R es butilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R es propilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R es etilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es metilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es fenilo sustituido. En algunas realizaciones, R es fenilo.

En algunas realizaciones, R es carbociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es carbociclilo monocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es cicloheptilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es ciclohexilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es ciclopentilo opcionalmente sustituido. En algunas

realizaciones, R es ciclobutilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un ciclopropilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es carbociclilo bicíclico opcionalmente sustituido.

5 En algunas realizaciones, R es un arilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un anillo de arilo bicíclico opcionalmente sustituido.

10 En algunas realizaciones, R es un heteroarilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, azufre u oxígeno. En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros sin sustituir que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, azufre u oxígeno.

15 En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo monocíclico de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

20 En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R se selecciona de pirrolilo, furanilo o tienilo.

25 En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 átomo de nitrógeno, y un heteroátomo adicional seleccionado de azufre u oxígeno. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo o isoxazolilo opcionalmente sustituido.

30 En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo de 6 miembros que tiene 1-3 átomos de nitrógeno. En otras realizaciones, R es un anillo de heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 átomos de nitrógeno. En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 átomos de nitrógeno. En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 nitrógeno. Los grupos R a modo de ejemplo incluyen piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo o tetrazinilo opcionalmente sustituido.

35 En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo bicíclico de 8-10 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En otras realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1 heteroátomo independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un indolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un azabicyclo[3.2.1]octanilo opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un azaindolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un bencimidazolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un benzotiazolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un benzoxazolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un indazolilo opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

50 En ciertas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En otras realizaciones, R es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1 heteroátomo independientemente seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un quinolinilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un isoquinolinilo opcionalmente sustituido. Según un aspecto, R es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es una quinazolina o una quinoxalina.

60 En algunas realizaciones, R es un heterociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo

heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros sin sustituir que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

En algunas realizaciones, R es un heterocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico parcialmente insaturado de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico parcialmente insaturado de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 átomos de oxígeno.

En ciertas realizaciones, R es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R es oxirano, oxetano, tetrahydrofuran, tetrahydropyran, oxepano, aziridino, azetidino, pirrolidino, piperidino, azepano, tiirano, tietano, tetrahydrotiofeno, tetrahydrothiopyran, tiepano, dioxolano, oxatolano, oxazolidino, imidazolidino, tiazolidino, ditiolano, dioxano, morfolino, oxatiano, piperazino, tiomorfolino, ditanio, dioxepano, oxazepano, oxatiepano, ditiepano, diazepano, dihydrofuran, tetrahydropyran, oxepano, pirolidino, piperidino, azepano, dihydrothiopheno, tetrahydrothiopyran, thiepano, oxazolidino, oxazinanono, oxazepano, dioxolanono, dioxanonono, dioxepano, oxatiolanono, oxatianono, oxatiepanono, tiazolidinono, tiazinanono, tiazepano, imidazolidinono, tetrahydropyrimidinono, diazepano, imidazolidinadionono, oxazolidinadionono, tiazolidinadionono, dioxolanedionono, oxatolanedionono, piperazinadionono, morfolinadionono, tiomorfolinadionono, tetrahydrothiopyran, tetrahydrofuran, morfolino, tiomorfolino, piperidino, piperazino, pirrolidino, tetrahydrothiopyran o tetrahydrothiopyran. En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

En ciertas realizaciones, R es un anillo monocíclico parcialmente insaturado de 5-6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R es un grupo tetrahydropyridino, dihydrothiazolo, dihydrooxazolo u oxazolino opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R es un anillo heterocíclico bicíclico saturado o parcialmente insaturado de 8-10 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R es un indolino opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es un isoindolino opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R es una 1, 2, 3, 4-tetrahydroquinolina opcionalmente sustituida. En algunas realizaciones, R es una 1, 2, 3, 4-tetrahydroisoquinolina opcionalmente sustituida.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, cada R' es independientemente-R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, o:

dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido, o

dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R' es -R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, en donde R es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, R' es -R, en donde R es como se ha definido y se describe anteriormente y en el presente documento. En algunas realizaciones, R' es hidrógeno.

En algunas realizaciones, R' es -C(O)R, en donde R es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R' es -CO<sub>2</sub>R, en donde R es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R' es -SO<sub>2</sub>R, en donde R es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, -Cy- es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbociclileno, arileno, heteroarileno o heterociclileno.

En algunas realizaciones, -Cy- es fenileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, -Cy- es carbociclileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, -Cy- es arileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones,

-Cy- es heteroarileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, -Cy- es heterociclileno opcionalmente sustituido.

5 Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, cada uno de X, Y y Z es independientemente -O-, -S-, -N(-L-R<sup>1</sup>)- o L, en donde cada uno de L y R<sup>1</sup> es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe a continuación.

10 En algunas realizaciones, X es -O-. En algunas realizaciones, X es -S-. En algunas realizaciones, X es -O- o -S-. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde X es -O-. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde X es -S-. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde X es -O-, y al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde X es -S-. En algunas realizaciones, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde X es -O-, y al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde L es un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-.

20 En algunas realizaciones, X es -N(-L-R<sup>1</sup>)-. En algunas realizaciones, X es -N(R<sup>1</sup>)-. En algunas realizaciones, X es -N(R')-. En algunas realizaciones, X es -N(R)-. En algunas realizaciones, X es -NH-.

25 En algunas realizaciones, X es L. En algunas realizaciones, X es un enlace covalente. En algunas realizaciones, X es o un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-. En algunas realizaciones, X es alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido o alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>. En algunas realizaciones, X es metileno.

En algunas realizaciones, Y es -O-. En algunas realizaciones, Y es -S-.

35 En algunas realizaciones, Y es -N(-L-R<sup>1</sup>)-. En algunas realizaciones, Y es -N(R<sup>1</sup>)-. En algunas realizaciones, Y es -N(R')-. En algunas realizaciones, Y es -N(R)-. En algunas realizaciones, Y es -NH-.

40 En algunas realizaciones, Y es L. En algunas realizaciones, Y es un enlace covalente. En algunas realizaciones, Y es o un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-. En algunas realizaciones, Y es un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido o alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>. En algunas realizaciones, Y es metileno.

45 En algunas realizaciones, Z es -O-. En algunas realizaciones, Z es -S-.

En algunas realizaciones, Z es -N(-L-R<sup>1</sup>)-. En algunas realizaciones, Z es -N(R<sup>1</sup>)-. En algunas realizaciones, Z es -N(R')-. En algunas realizaciones, Z es -N(R)-. En algunas realizaciones, Z es -NH-.

50 En algunas realizaciones, Z es L. En algunas realizaciones, Z es un enlace covalente. En algunas realizaciones, Z es o un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-. En algunas realizaciones, Z es un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido o alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>. En algunas realizaciones, Z es metileno.

60 Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, L es un enlace covalente o un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-.

65 En algunas realizaciones, L es un enlace covalente. En algunas realizaciones, L es un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquencileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-,

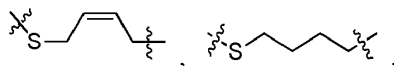


-Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-.

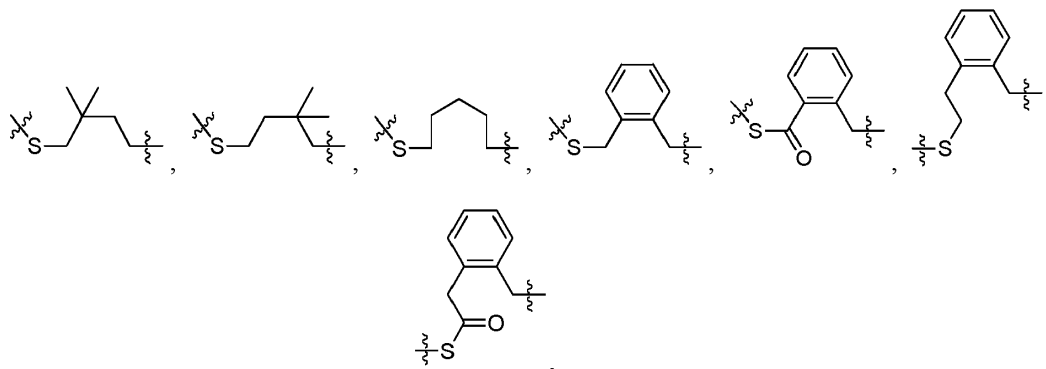
En algunas realizaciones, L tiene la estructura de -L<sup>1</sup>-V-, en donde:

5

L<sup>1</sup> es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de



10

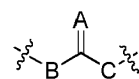


15

alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbocicileno, arileno, heteroalquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicileno y heteroarileno;

V se selecciona de -O-, -S-, -NR', C(R')<sub>2</sub>-, -S-S-, -B-S-S-C-,

20



, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arileno, heteroalquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heterocicileno y heteroarileno;

25

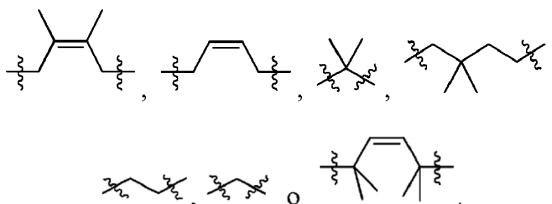
A es =O, =S, =NR' o =C(R')<sub>2</sub>;

cada uno de B y C es independientemente -O-, -S-, -NR', -C(R')<sub>2</sub>-, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, carbocicileno, arileno, heterocicileno o heteroarileno; y

30

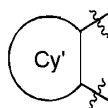
cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> es



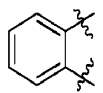
35

En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> es

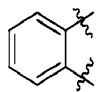


40

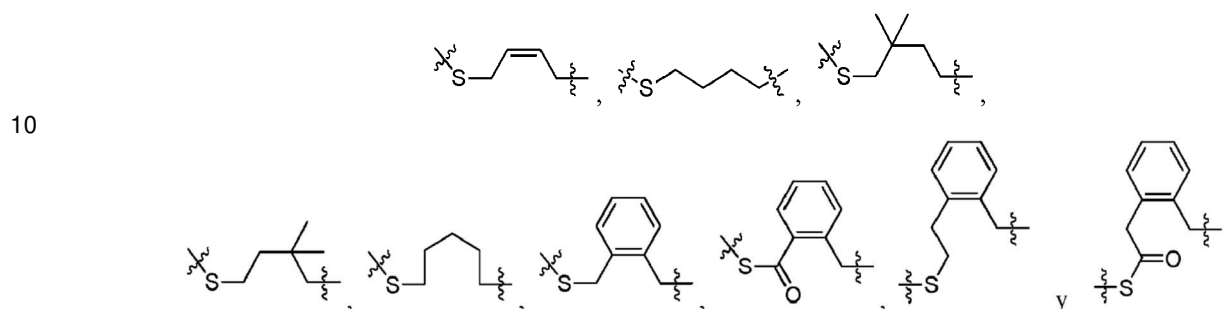
, en donde el anillo Cy' es un arileno, carbocicileno, heteroarileno o heterocicileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> es opcionalmente sustituido



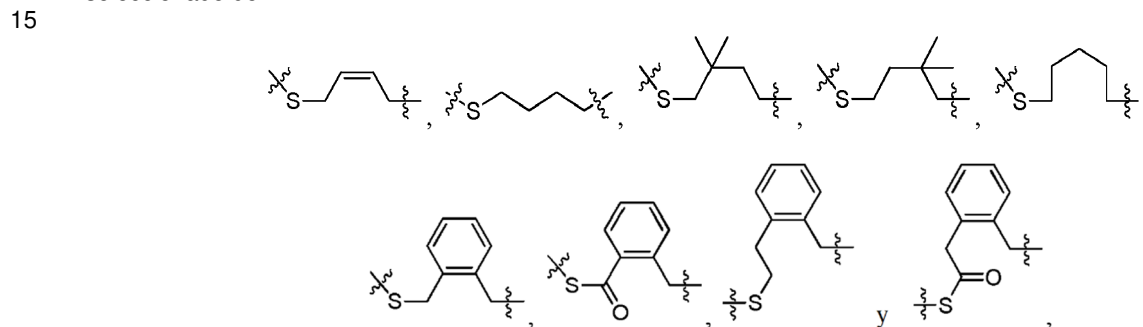
En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> es



5 En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> está conectado a X. En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de

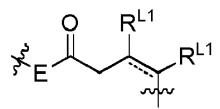


15 y el átomo de azufre está conectado con V. En algunas realizaciones, L<sup>1</sup> es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de



20 y el átomo de carbono está conectado con X.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



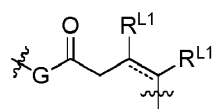
en donde:

30 E es -O-, -S-, -NR' o -C(R')<sub>2</sub>;

----- es un enlace sencillo o doble;

los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido; y cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



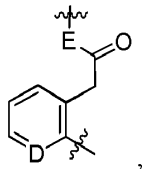
en donde:

G es -O-, -S- o -NR';

---- es un único o doble enlace; y

5 los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



10

en donde:

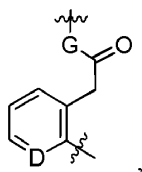
E es -O-, -S-, -NR' o -C(R')<sub>2</sub>;

15

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



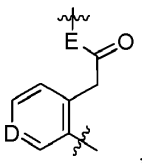
25 en donde:

G es -O-, -S- o -NR';

25

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-.

30 En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



35 en donde:

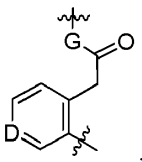
E es -O-, -S-, -NR' o -C(R')<sub>2</sub>;

35

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

40 cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



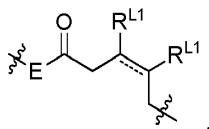
45

en donde:

G es -O-, -S- o -NR';

5 D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



10

en donde:

E es -O-, -S-, -NR'- o -C(R')<sub>2</sub>;

15

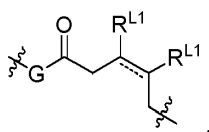
----- es un enlace sencillo o doble;

los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido;

20

y cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



25

en donde:

G es -O-, -S- o -NR';

30

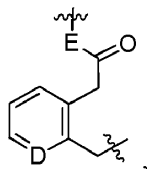
----- es un enlace sencillo o doble;

los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido;

35

y cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



40

en donde:

E es -O-, -S-, -NR'- o -C(R')<sub>2</sub>;

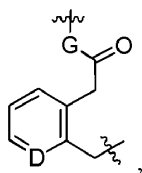
45

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:

50



en donde:

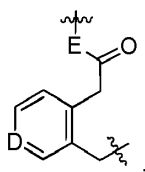
5 G es -O-, -S- o -NR';

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

10

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



15 en donde:

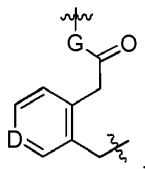
E es -O-, -S-, -NR'- o -C(R')<sub>2</sub>-;

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

20

cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



25

en donde:

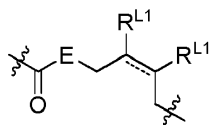
G es -O-, -S- o -NR';

30

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



en donde:

40

E es -O-, -S-, -NR'- o -C(R')<sub>2</sub>-;

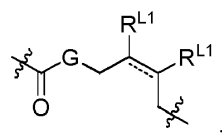
====

45

es un enlace sencillo o doble;

los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido; y cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



en donde:

10

G es -O-, -S- o -NR';

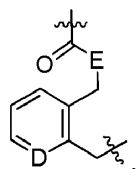
----- es un enlace sencillo o doble;

15

los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido; y cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:

20



en donde:

25

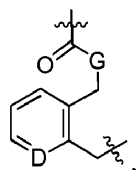
E es -O-, -S-, -NR' o -C(R')<sub>2</sub>;

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

30

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



35

en donde:

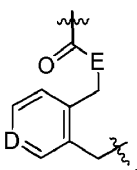
G es -O-, -S- o -NR';

40

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

R' es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



45

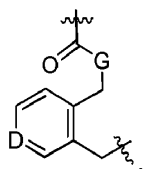
en donde:

E es -O-, -S-, -NR'- o -C(R')<sub>2</sub>-;

5 D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y  
cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:

10



en donde:

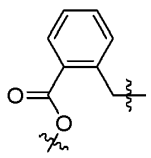
15 G es -O-, -S- o -NR';

D es =N-, =C(F)-, =C(Cl)-, =C(Br)-, =C(I)-, =C(CN)-, =C(NO<sub>2</sub>)-, =C(CO<sub>2</sub>-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>))- o =C(CF<sub>3</sub>)-; y

R' es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

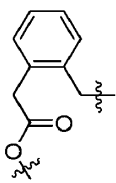
20

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



25 en donde el anillo de fenilo está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el anillo de fenilo no está sustituido. En algunas realizaciones, el anillo de fenilo está sustituido.

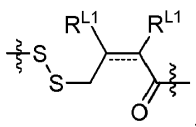
En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



30

en donde el anillo de fenilo está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el anillo de fenilo no está sustituido. En algunas realizaciones, el anillo de fenilo está sustituido.

35 En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



en donde:

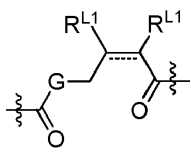
40



es un enlace sencillo o doble; y

45 los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:



5 en donde:

G es -O-, -S- o -NR';

-----

10 es un enlace sencillo o doble; y

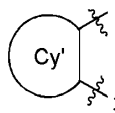
15 los dos R<sup>L1</sup> se toman conjuntamente con los dos átomos de carbono a los que están unidos para formar un anillo de arilo, carbocíclico C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>, de heteroarilo o heterocíclico opcionalmente sustituido.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, E es -O-, -S-, -NR' o -C(R')<sub>2</sub>-, en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, E es -O-, -S- o -NR'. En algunas realizaciones, E es -O-, -S- o -NH-. En algunas realizaciones, E es -O-. En algunas realizaciones, E es -S-. En algunas realizaciones, E es -NH-.

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, G es -O-, -S- o -NR', en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, G es -O-, -S- o -NH-. En algunas realizaciones, G es -O-. En algunas realizaciones, G es -S-. En algunas realizaciones, G es -NH-.

En algunas realizaciones, L es -L<sup>3</sup>-G-, en donde:

30 L<sup>3</sup> es un alquileo o alquenileo C<sub>1</sub>-C<sub>5</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -O-, -S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- o



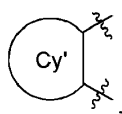
35 y

en donde cada uno de G, R' y el anillo Cy' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, L es -L<sup>3</sup>-S-, en donde L<sup>3</sup> es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, L es -L<sup>3</sup>-O-, en donde L<sup>3</sup> es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, L es -L<sup>3</sup>-N(R')-, en donde cada uno de L<sup>3</sup> y R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, L es -L<sup>3</sup>-NH-, en donde cada uno de L<sup>3</sup> y R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L<sup>3</sup> es un alquileo o alquenileo C<sub>5</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -O-, -S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- o

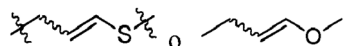
50



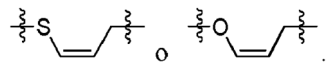




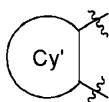
En algunas realizaciones, L es



5 En algunas realizaciones, L es

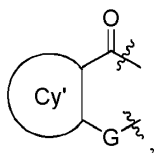


10 En algunas realizaciones, L<sup>3</sup> es un alquileno o alquenileno C<sub>2</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -O-, -S-, -N(R<sup>1</sup>)-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR<sup>1</sup>)-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>- o

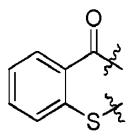


15 y cada uno de R<sup>1</sup> y Cy' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L<sup>3</sup>-G- es

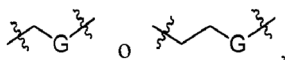


20 en donde cada uno de G y Cy' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, L es

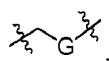


25 En algunas realizaciones, L es -L<sup>4</sup>-G-, en donde L<sup>4</sup> es un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> opcionalmente sustituido; y G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, L es -L<sup>4</sup>-G-, en donde L<sup>4</sup> es un alquileno C<sub>1</sub>-C<sub>2</sub> opcionalmente sustituido; G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es -L<sup>4</sup>-G-, en donde L<sup>4</sup> es un metileno opcionalmente sustituido; G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es -L<sup>4</sup>-G-, en donde L<sup>4</sup> es metileno; G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es -L<sup>4</sup>-G-, en donde L<sup>4</sup> es un -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- opcionalmente sustituido; G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es -L<sup>4</sup>-G-, en donde L<sup>4</sup> es -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-; G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; y G está conectado a R<sup>1</sup>.

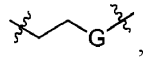
En algunas realizaciones, L es



40 en donde G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es

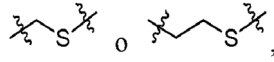


45 en donde G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es



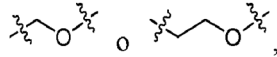
en donde G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento, y G está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es

5



en donde el átomo de azufre está conectado a R<sup>1</sup>. En algunas realizaciones, L es

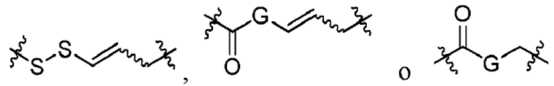
10



en donde el átomo de oxígeno está conectado a R<sup>1</sup>.

En algunas realizaciones, L es

15



en donde G es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

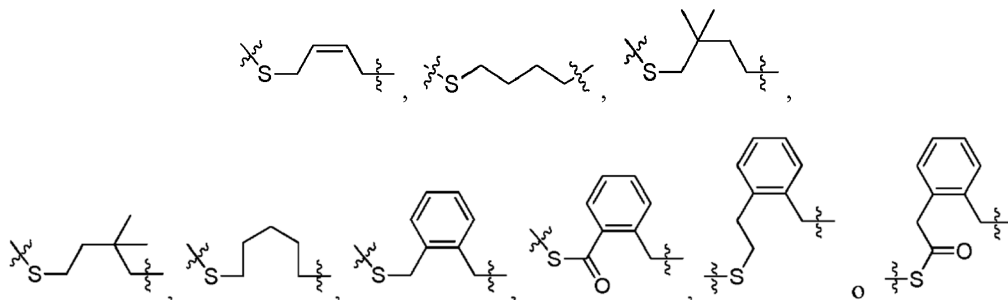
20 En algunas realizaciones, L es -S-R<sup>L3</sup>- o -S-C(O)-R<sup>L3</sup>-, en donde R<sup>L3</sup> es un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada uno de R' y -Cy- es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, L es -S-R<sup>L3</sup>- o -S-C(O)-R<sup>L3</sup>-, en donde R<sup>L3</sup> es un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, L es -S-R<sup>L3</sup>- o -S-C(O)-R<sup>L3</sup>-, en donde R<sup>L3</sup> es un alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, L es -S-R<sup>L3</sup>- o -S-C(O)-R<sup>L3</sup>-, en donde R<sup>L3</sup> es un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, En algunas realizaciones, R<sup>L3</sup> es un -S-(alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-, -S-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-, -S-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-arilen-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-, -S-CO-arilen-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)- o -S-CO-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-arilen-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)- opcionalmente sustituido.

25

30

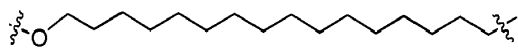
En algunas realizaciones, L es

35



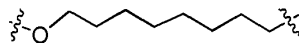
En algunas realizaciones, L es

40



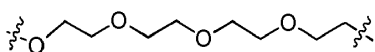
En algunas realizaciones, L es

45



En algunas realizaciones,

50



En algunas realizaciones, el átomo de azufre en las realizaciones de L descritas anteriormente y en el presente documento está conectado a X. En algunas realizaciones, el átomo de azufre en las realizaciones de L descritas anteriormente y en el presente documento está conectado a R<sup>1</sup>.

5

Como se define, en general, anteriormente y en el presente documento, R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

10

15

20

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es hidrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es halógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -F. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -Cl. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -Br. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -I.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es R en donde R es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

25

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es hidrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>, fenilo, carbociclilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo.

30

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es hexilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es pentilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es butilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es propilo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es etilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es metilo opcionalmente sustituido.

35

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es fenilo sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es fenilo.

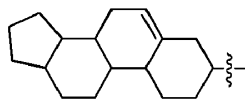
40

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es carbociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es carbociclilo C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es carbociclilo monocíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es cicloheptilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es ciclohexilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es ciclopentilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un ciclopropilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es carbociclilo bicíclico opcionalmente sustituido.

45

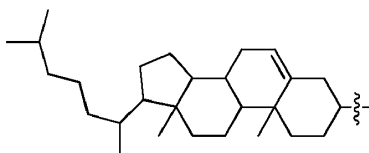
50

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un hidrocarburo policíclico C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un hidrocarburo policíclico C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es opcionalmente sustituido

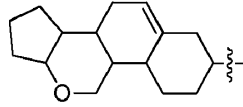


55

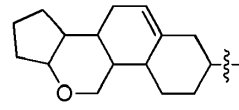
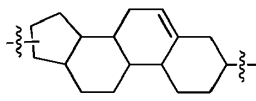
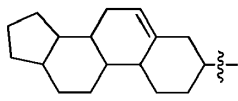
En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es opcionalmente sustituido

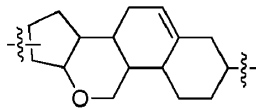


5 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido que comprende uno o más restos de hidrocarburo policíclico opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido que comprende uno o más restos de hidrocarburo policíclico opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido que comprende uno o más opcionalmente sustituido



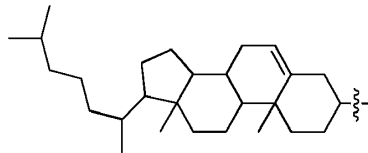
15

o



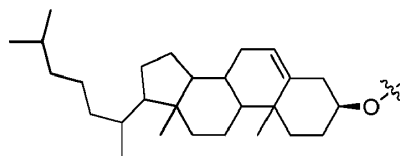
20

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



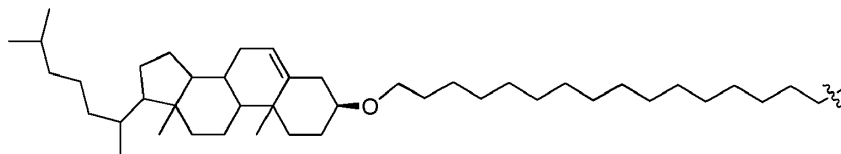
25

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



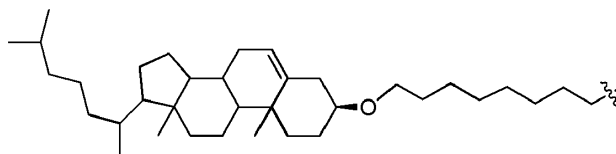
30

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es

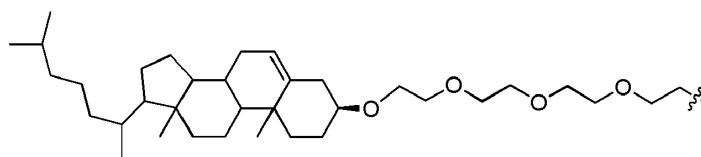


35

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un arilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de arilo bicíclico opcionalmente sustituido.

5 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un heteroarilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, azufre u oxígeno. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5-6 miembros sin sustituir que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, azufre u oxígeno.

15 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo monocíclico de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

20 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo monocíclico de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 heteroátomo seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> se selecciona de pirrolilo, furanilo o tienilo.

25 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 átomo de nitrógeno, y un heteroátomo adicional seleccionado de azufre u oxígeno. Los grupos R<sup>1</sup> a modo de ejemplo incluyen pirazolilo, imidazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, oxazolilo o isoxazolilo opcionalmente sustituido.

30 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo de 6 miembros que tiene 1-3 átomos de nitrógeno. En otras realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 átomos de nitrógeno. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 átomos de nitrógeno. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1 nitrógeno. Los grupos R<sup>1</sup> a modo de ejemplo incluyen piridinilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, triazinilo o tetrazinilo opcionalmente sustituido.

35 En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo bicíclico de 8-10 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En otras realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1 heteroátomo independientemente seleccionado de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un indolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un azabiciclo[3.2.1]octanilo opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un azaindolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un bencimidazolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un benzotiazolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un benzoxazolilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un indazolilo opcionalmente sustituido. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 5,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 3 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

50 En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En otras realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 1 heteroátomo independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un quinolinilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un isoquinolinilo opcionalmente sustituido. Según un aspecto, R<sup>1</sup> es un anillo de heteroarilo 6,6-condensado opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es una quinazolina o una quinoxalina.

60

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un heterociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros sin sustituir que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un heterociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico parcialmente insaturado de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico parcialmente insaturado de 6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 2 átomos de oxígeno.

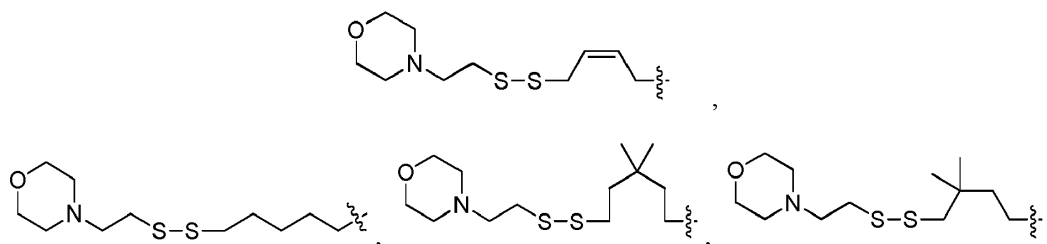
En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 3-7 miembros que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es oxiraniilo, oxetaniilo, tetrahydrofuranilo, tetrahydropiranilo, oxepaniilo, aziridinoilo, azetidinoilo, pirrolidinilo, piperidinilo, azepaniilo, tiiraniilo, tietaniilo, tetrahydrotiofenilo, tetrahydrotiopiranilo, tiepaniilo, dioxolaniilo, oxatiolaniilo, oxazolidinilo, imidazolidinilo, tiazolidinilo, ditiolaniilo, dioxaniilo, morfolinilo, oxatianiilo, piperazinilo, tiomorfolinilo, ditianiilo, dioxepaniilo, oxazepaniilo, oxatiepaniilo, ditiepaniilo, diazepaniilo, dihydrofuranilo, tetrahydropiranilo, oxepaniilo, pirolidinonilo, piperidinonilo, azepaniilo, dihydrotiofenonilo, tetrahydrotiopiranonilo, thiepanonilo, oxazolidinonilo, oxazinonilo, oxazepaniilo, dioxolanonilo, dioxanonilo, dioxepaniilo, oxatiolinonilo, oxatianonilo, oxathiepanonilo, tiazolidinonilo, tiazinanonilo, tiazepaniilo, imidazolidinonilo, tetrahydropirimidinonilo, diazepaniilo, imidazolidinadionilo, oxazolidinadionilo, tiazolidinadionilo, dioxolanedionilo, oxatiolanedionilo, piperazinadionilo, morfolinadionilo, tiomorfolinadionilo, tetrahydropiranilo, tetrahydrofuranilo, morfolinilo, tiomorfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirrolidinilo, tetrahydrotiofenilo o tetrahydrotiopiranilo. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico saturado o parcialmente insaturado de 5 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre.

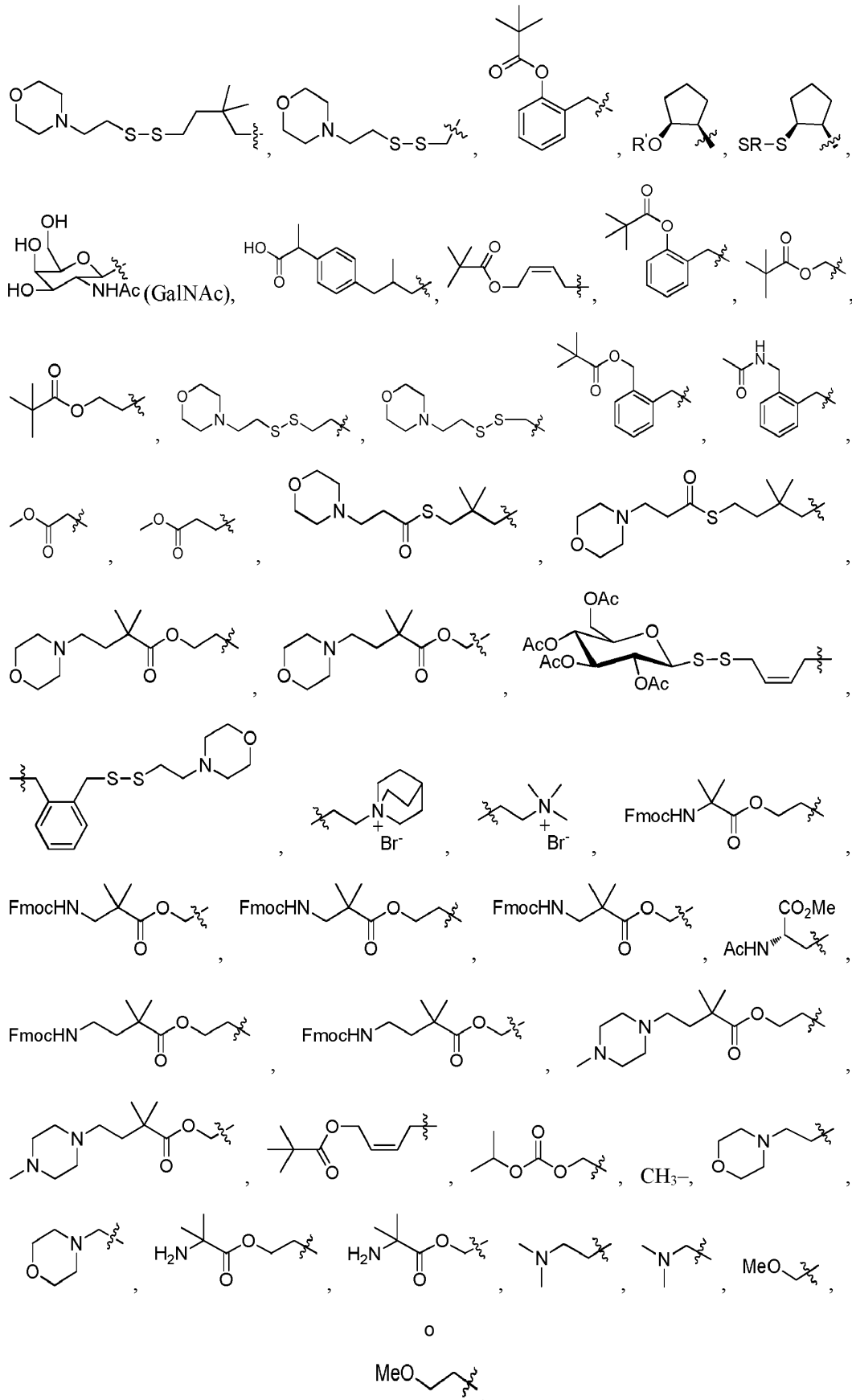
En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo monocíclico parcialmente insaturado de 5-6 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-2 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En ciertas realizaciones, R<sup>1</sup> es un grupo tetrahydropiridinilo, dihydrotiazolilo, dihydrooxazolilo u oxazolínilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un anillo heterocíclico bicíclico saturado o parcialmente insaturado de 8-10 miembros opcionalmente sustituido que tiene 1-4 heteroátomos independientemente seleccionados de nitrógeno, oxígeno o azufre. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un indolinilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un isoindolinilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es una 1,2,3,4-tetrahydroquinolina opcionalmente sustituida. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es una 1,2,3,4-tetrahydroisoquinolina opcionalmente sustituida.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas por un opcionalmente -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas por un opcionalmente -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -OC(O)- o -C(O)O-, en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

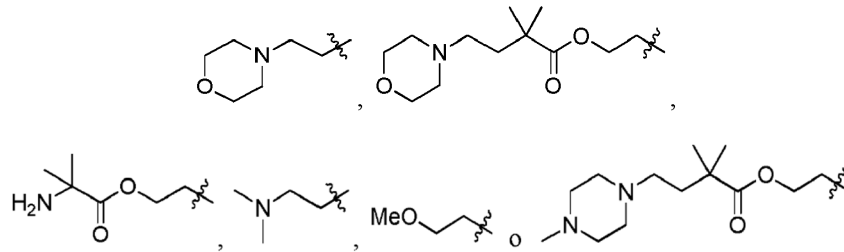
En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



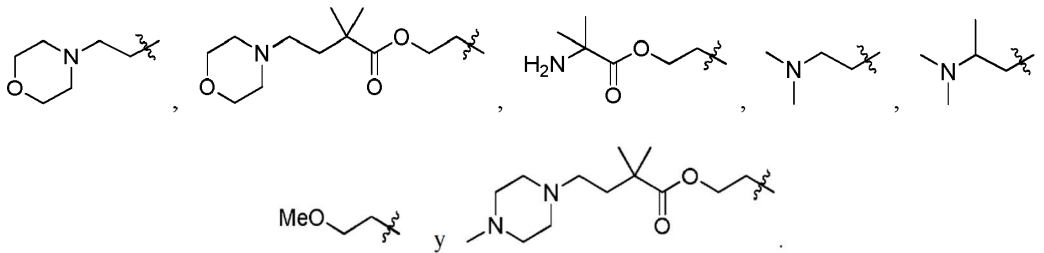


25 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>-,

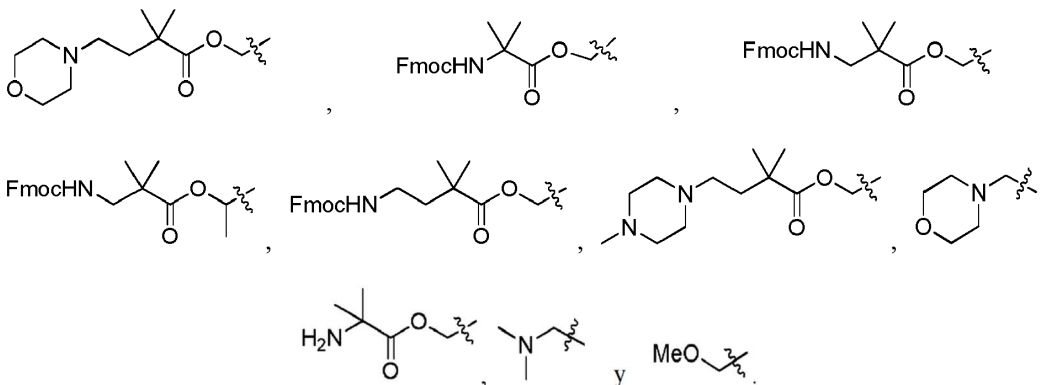




5 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> comprende un resto -(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>- terminal opcionalmente sustituido que está conectado a L. A modo de ejemplo, dichos grupos R<sup>1</sup> se representan a continuación:



10 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> comprende un resto -(CH<sub>2</sub>)- terminal opcionalmente sustituido que está conectado a L. A modo de ejemplo, dichos grupos R<sup>1</sup> se representan a continuación:

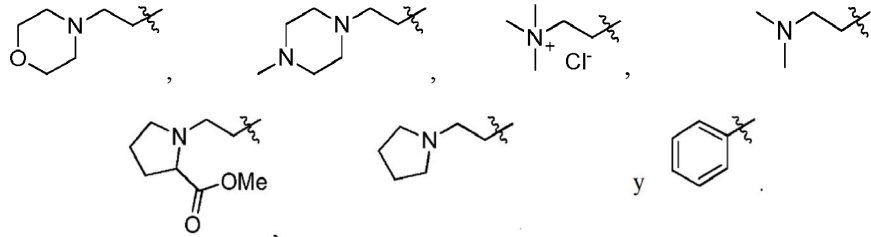


15 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -S-R<sup>L2</sup>, en donde R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniño C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, y cada uno de R' y -Cy- es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -S-R<sup>L2</sup>, en donde el átomo de azufre está conectado con el átomo de azufre en el grupo L.

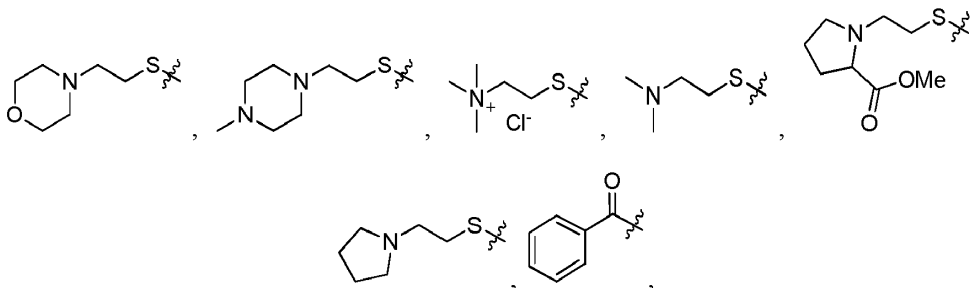
20 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -C(O)-R<sup>L2</sup>, en donde R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alqueno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueniño o C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-, y cada uno de R' y -Cy- es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -C(O)-R<sup>L2</sup>, en donde el grupo carbonilo está conectado con G en el grupo L. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es -C(O)-R<sup>L2</sup>, en donde el grupo carbonilo está conectado con el átomo de azufre en el grupo L.

30 En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es alqueniño C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -Cy- o -C(O)-. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -Cy-. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un heterociclino opcionalmente sustituido. En algunas

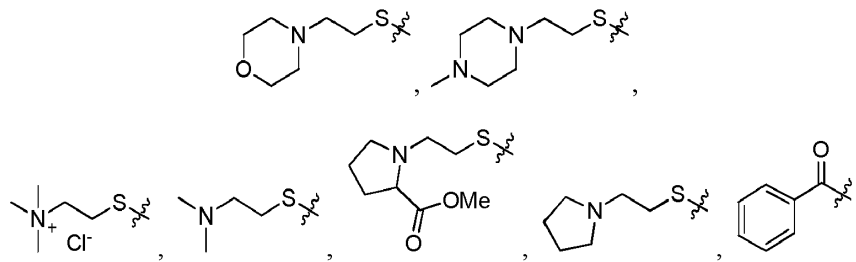
realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas por un arileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas por un heteroarileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas por un carbociclileno C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido en donde dos unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -Cy- o -C(O)-. En algunas realizaciones, R<sup>L2</sup> es un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub> opcionalmente sustituido en donde dos unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con -Cy- o -C(O)-. Los grupos R<sup>L2</sup> a modo de ejemplo se representan a continuación:



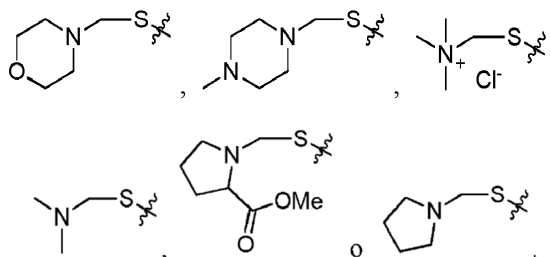
En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de



-S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, arilo, heteroalquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, heteroarilo y heterociclilo. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



o -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>). En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



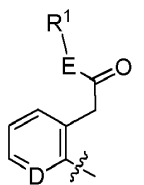
En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>), alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>, heteroalifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arilo, heterociclilo y heteroarilo.

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es



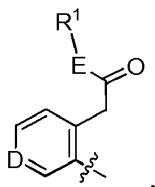
en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



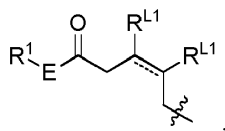
10 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



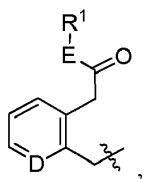
15 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



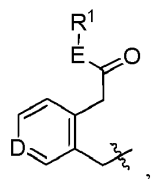
25 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



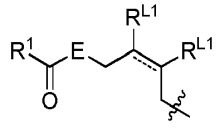
30 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



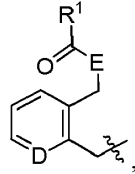
35 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

40 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



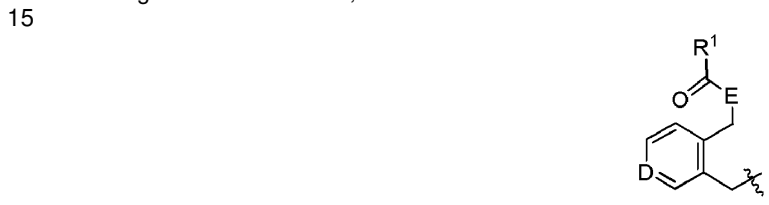
5 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



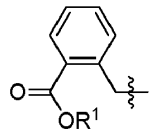
10 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



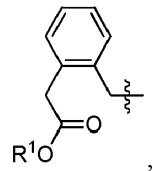
20 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



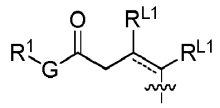
25 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



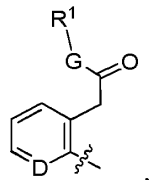
30 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



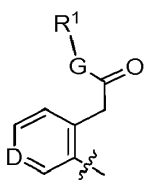
en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



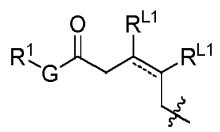
en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

10 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



15 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



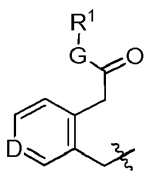
20 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

25 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



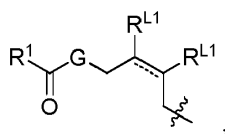
30 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



35 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

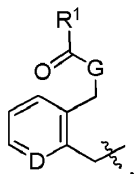
40 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

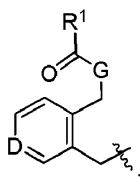
5

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



10 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

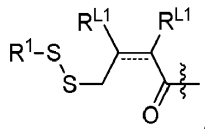
En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



15

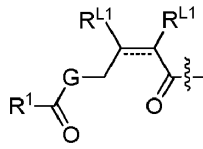
en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:



25 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, L tiene la estructura de:

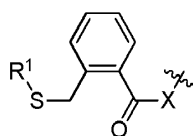


30

en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de:

35



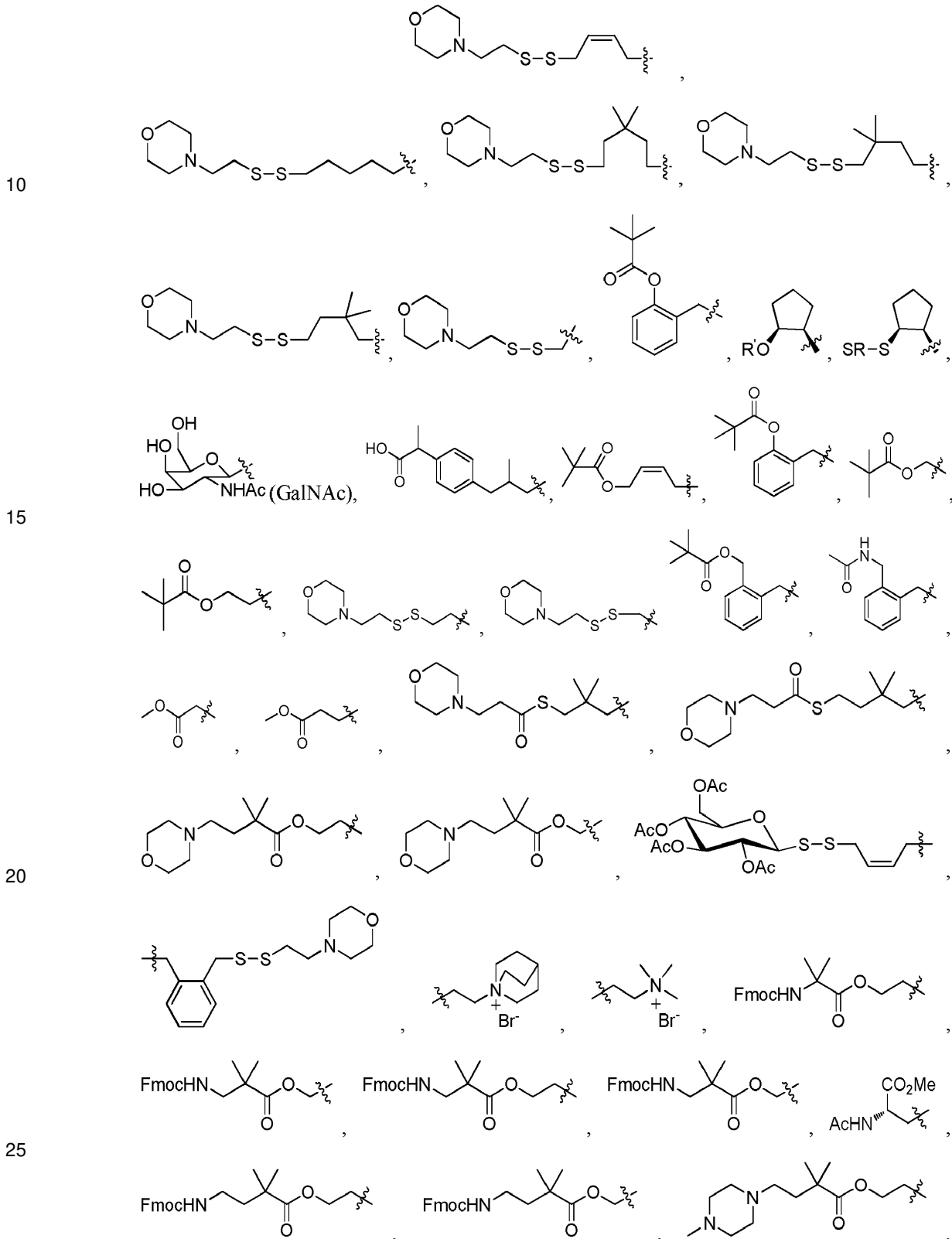
en donde:

el anillo de fenilo está opcionalmente sustituido, y

cada uno de R<sup>1</sup> y X es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

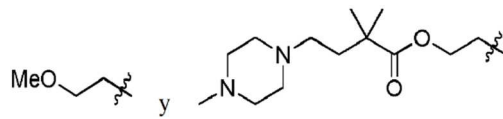
5

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> es

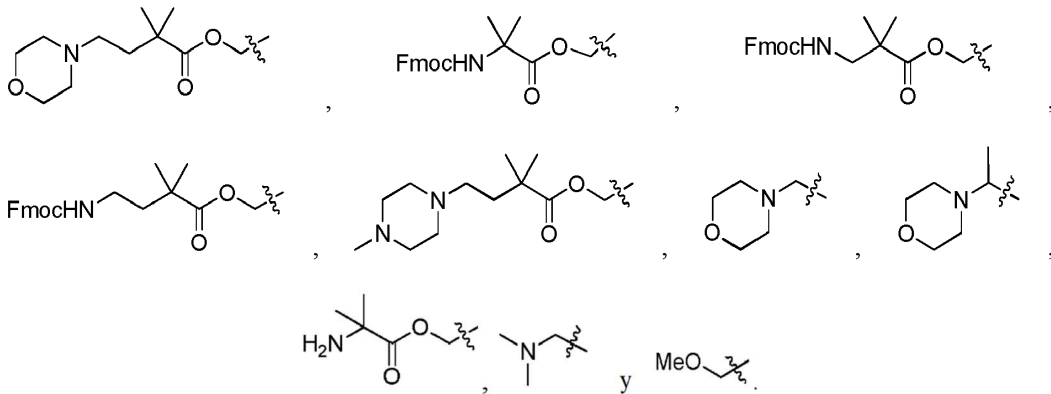




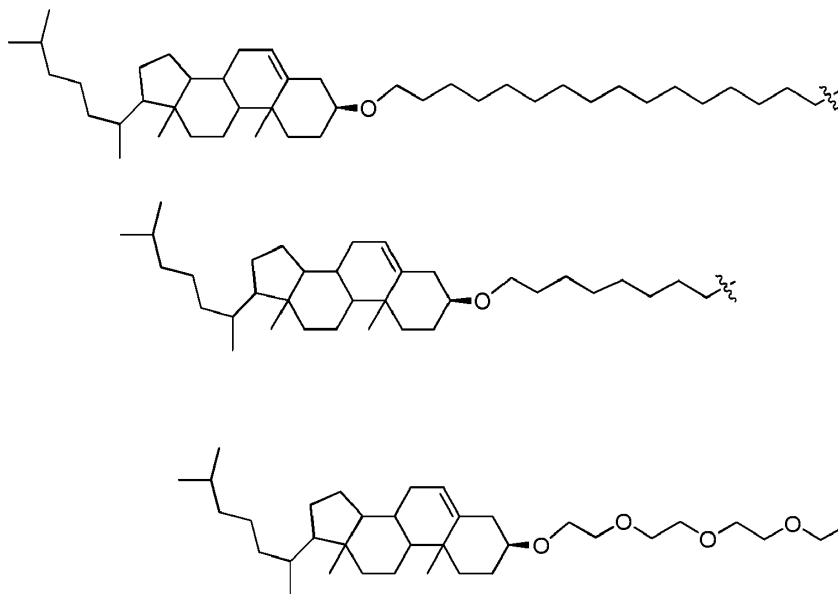




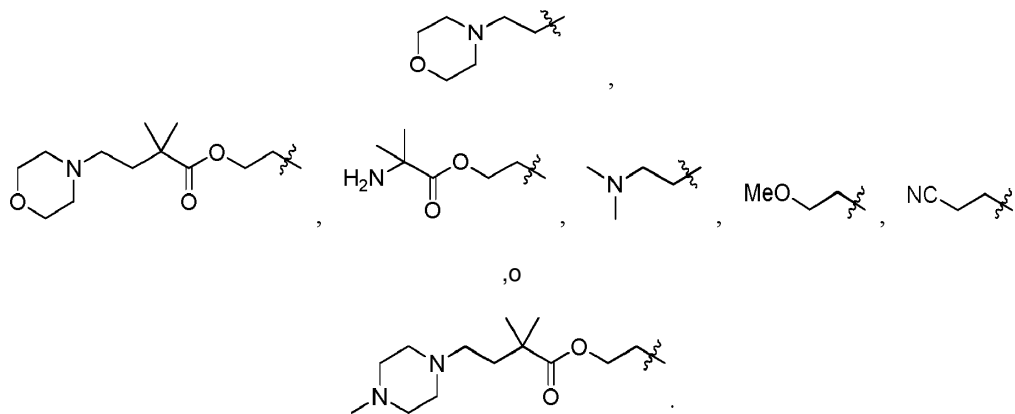
5 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> comprende a terminal opcionalmente sustituido - (CH<sub>2</sub>)- resto que está conectado a X. En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> comprende a terminal - (CH<sub>2</sub>)- resto que está conectado a X. A modo de ejemplo, dichos restos -L-R<sup>1</sup> se representan a continuación:



En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> es



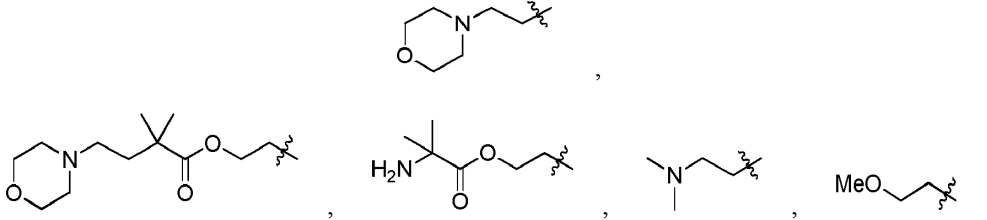
En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>-,



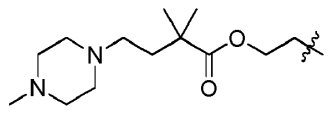
y X es -S-

En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> es CH<sub>3</sub>-

5



10 o

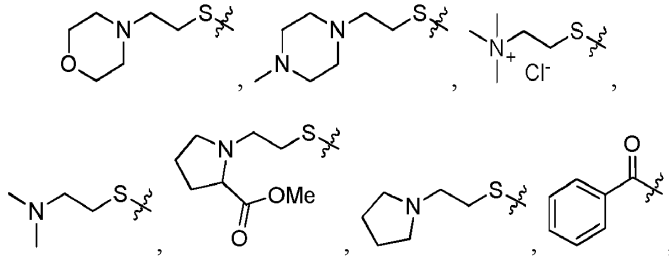


X es -S-, W es O, Y es -O-, y Z es -O-

15

En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es

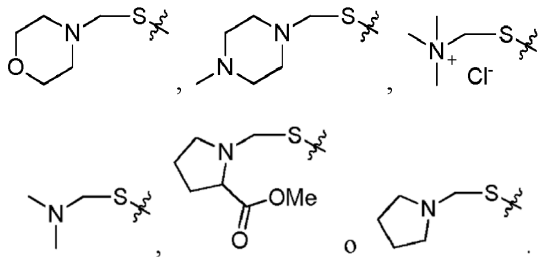
20



o -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>).

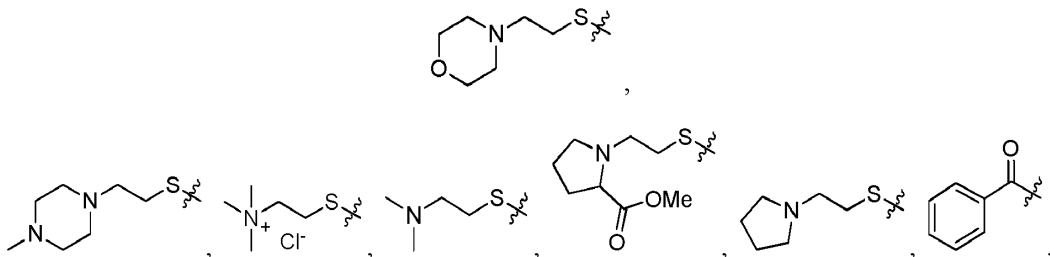
En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es

25



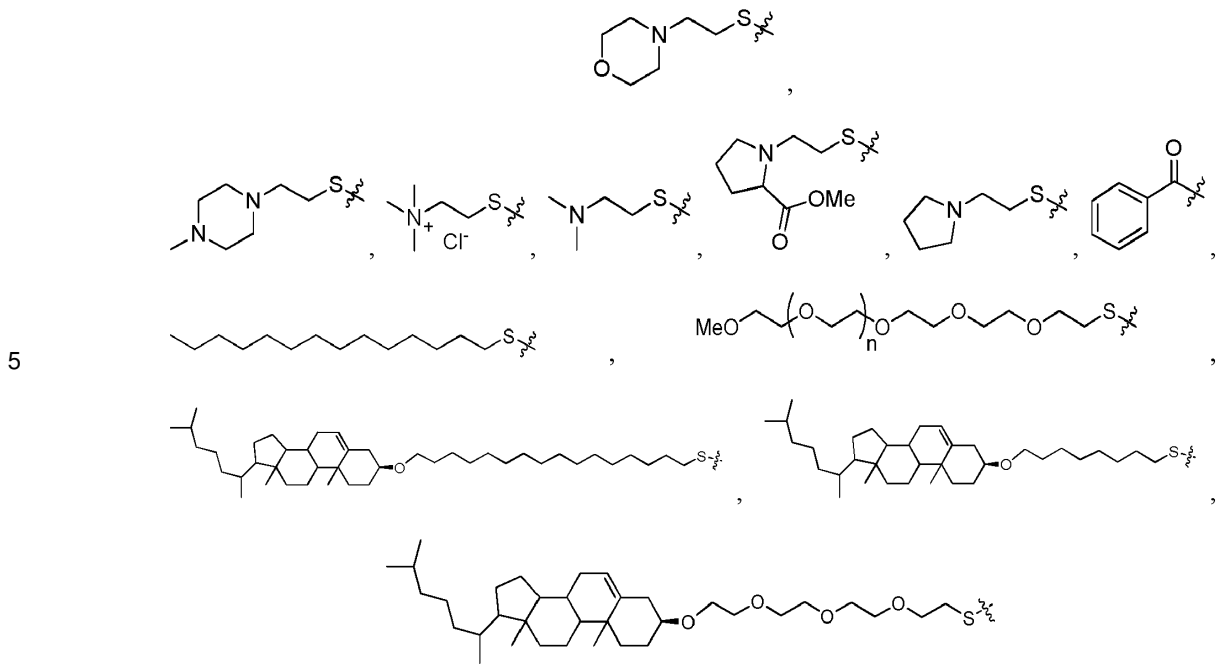
30 En algunas realizaciones, X es -O- o -S-, y R<sup>1</sup> es

35



o -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>).

En algunas realizaciones, X es -O- o -S-, y R<sup>1</sup> es

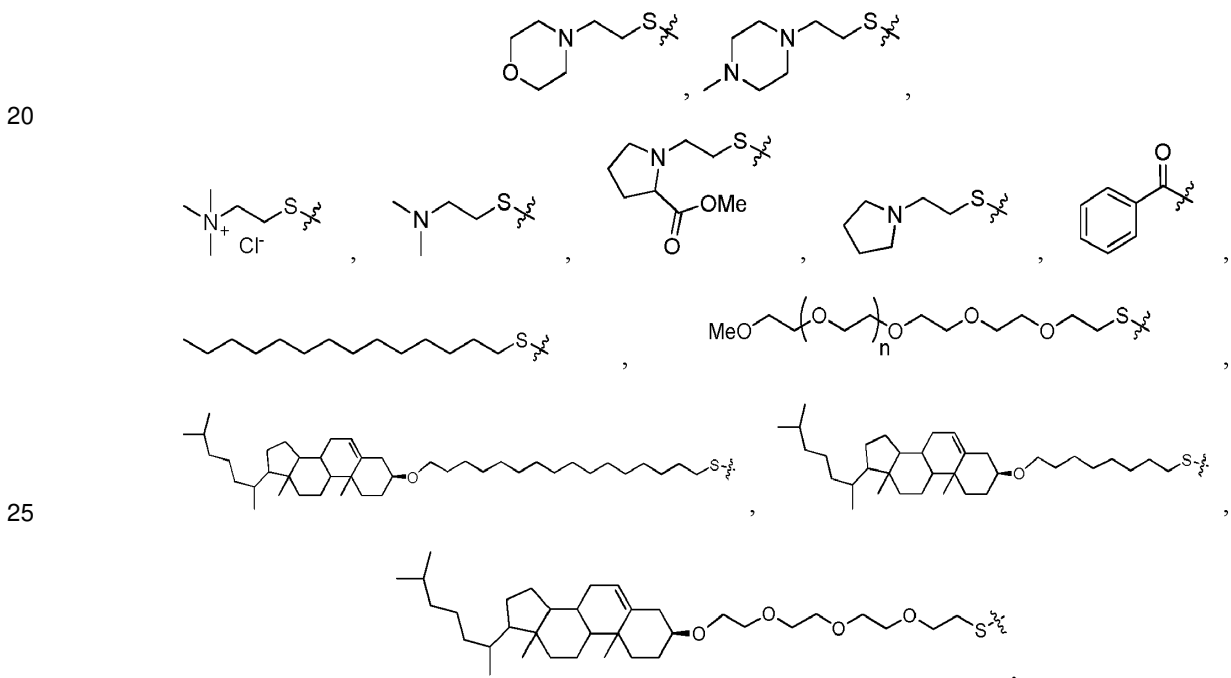


10 -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>).

En algunas realizaciones, L es un enlace covalente y -L-R<sup>1</sup> es R<sup>1</sup>.

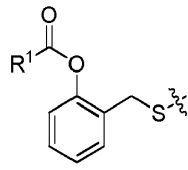
15 En algunas realizaciones, -L-R<sup>1</sup> no es hidrógeno.

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es R<sup>1</sup> es



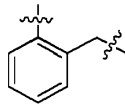
30 -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -S-(alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub>).

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de

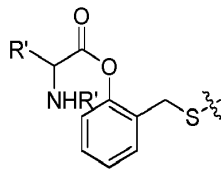


en donde el resto

5

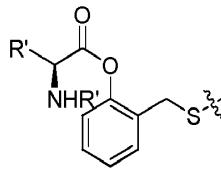


está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es



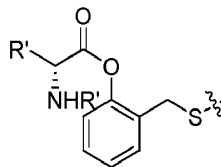
10

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es



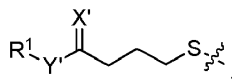
15

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es



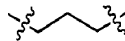
20

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de



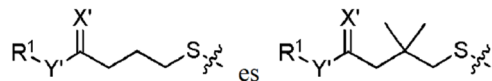
en donde X' es O o S, Y' es -O-, -S- o -NR', y el resto

25



está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, Y' es -O-, -S- o -NH-. En algunas realizaciones,

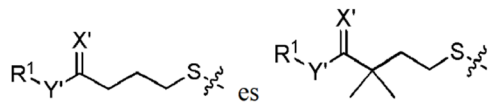
30

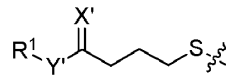


En algunas realizaciones,

35

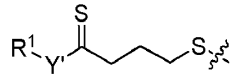
En algunas realizaciones,



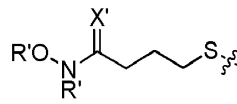


es

5

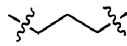


En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> tiene la estructura de



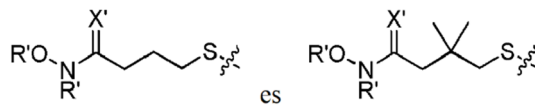
10

en donde X' es O o S, y el resto



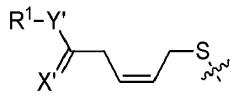
15

está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones,



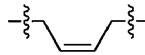
20

En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es

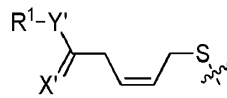


en donde

25

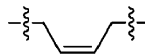


está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es



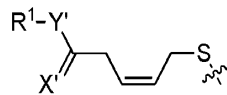
30

, en donde



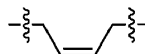
35

está sustituido. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es



40

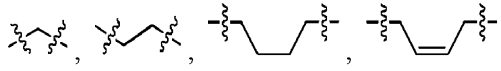
, en donde



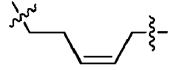
45

está sin sustituir.

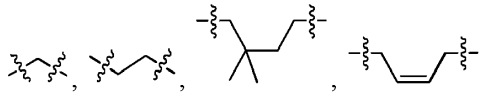
En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es R<sup>1</sup>-C(O)-S-L<sup>x</sup>-S-, en donde L<sup>x</sup> es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de



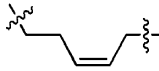
5 y



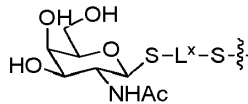
10 En algunas realizaciones, L<sup>x</sup> es



15 y

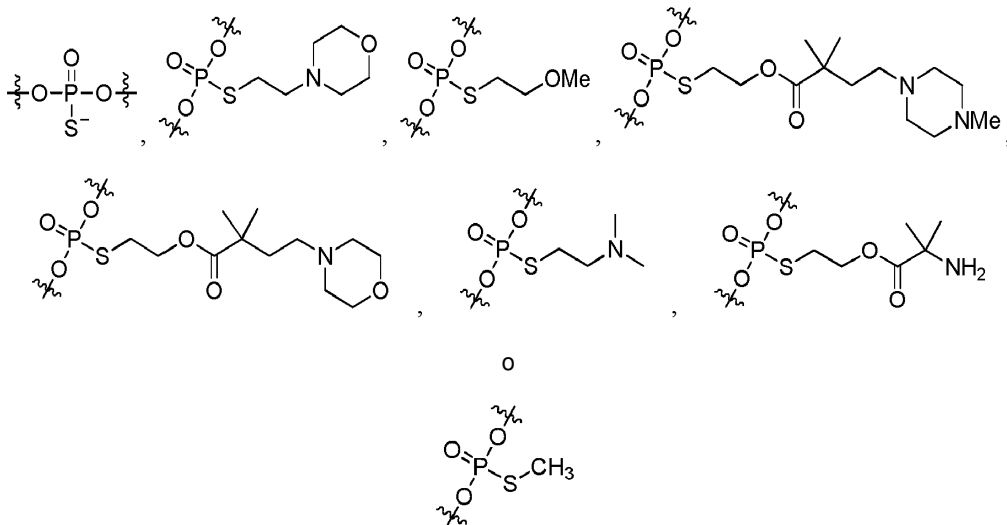


20 En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>C-S-S-L<sup>x</sup>-S-. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es R<sup>1</sup>-C(=X')-Y'-C(R)<sub>2</sub>-S-L<sup>x</sup>-S-. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es R-C(=X')-Y'-CH<sub>2</sub>-S-L<sup>x</sup>-S-. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es

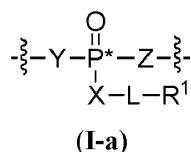


25 Como será apreciado por un experto en la técnica, muchos de los grupos -X-L-R<sup>1</sup> descritos en el presente documento son escindibles y se pueden convertir en -X- después de la administración a un sujeto. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es escindible. En algunas realizaciones, -X-L-R<sup>1</sup> es -S-L-R<sup>1</sup>, y se convierte en -S- después de la administración a un sujeto. En algunas realizaciones, la conversión es promovida por una enzima de un sujeto. Como se aprecia por un experto en la técnica, los métodos de determinación de si el grupo -S-L-R<sup>1</sup> se convierte en -S- después de la administración son ampliamente conocidos y puestos en práctica en la técnica, que incluye los usos para estudiar el metabolismo y farmacocinética de fármacos.

30 En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico que tiene la estructura de la fórmula I es

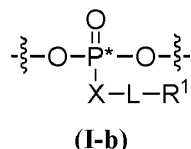


35 40 En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico de la fórmula I tiene la estructura de la fórmula I-a:



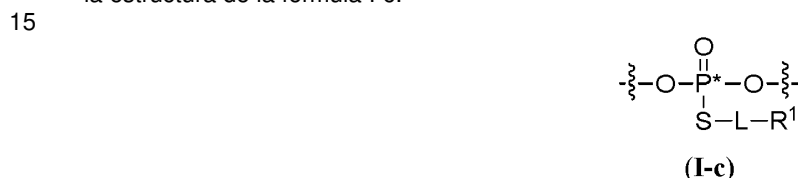
en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico de la fórmula I tiene la estructura de la fórmula I-b:



10 en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico de la fórmula I es un enlace de triéster de fosforotioato que tiene la estructura de la fórmula I-c:



en donde:

20 P\* es un átomo de fósforo asimétrico y es o Rp o Sp;

L es un enlace covalente o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquilenilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

35 cada R' es independientemente -R, -C(O)R, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, o:

dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido, o

40 dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

-Cy- es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbocicileno, arileno, heteroarileno o heterocicileno;

45 cada R es independientemente hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbocicilo, arilo, heteroarilo o heterocicilo;

cada



50

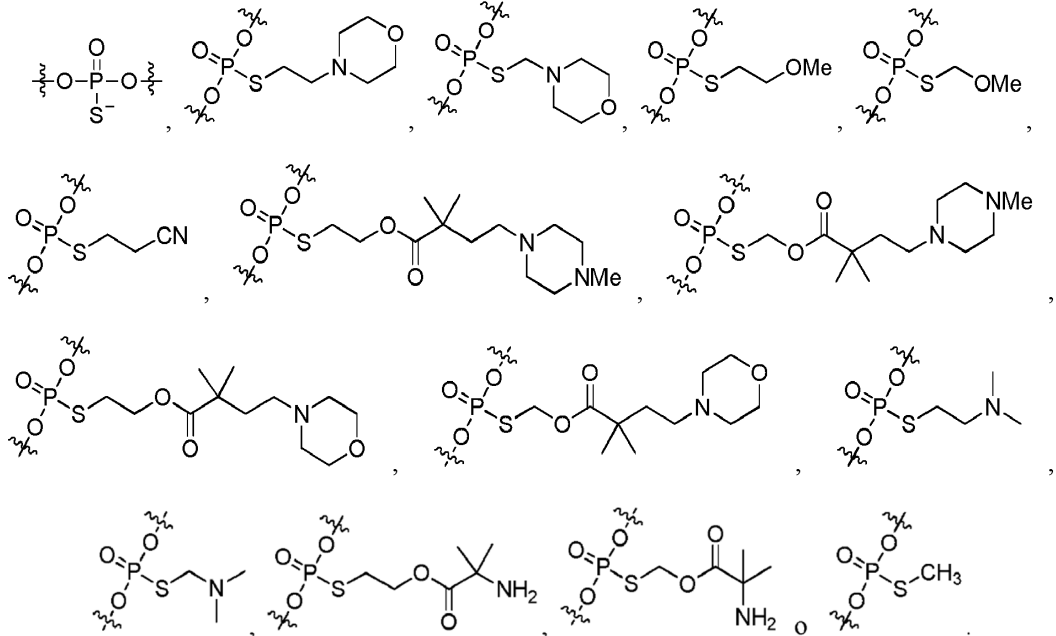


representa independientemente una conexión a un nucleósido; y

R<sup>1</sup> no es -H cuando L es un enlace covalente.

5

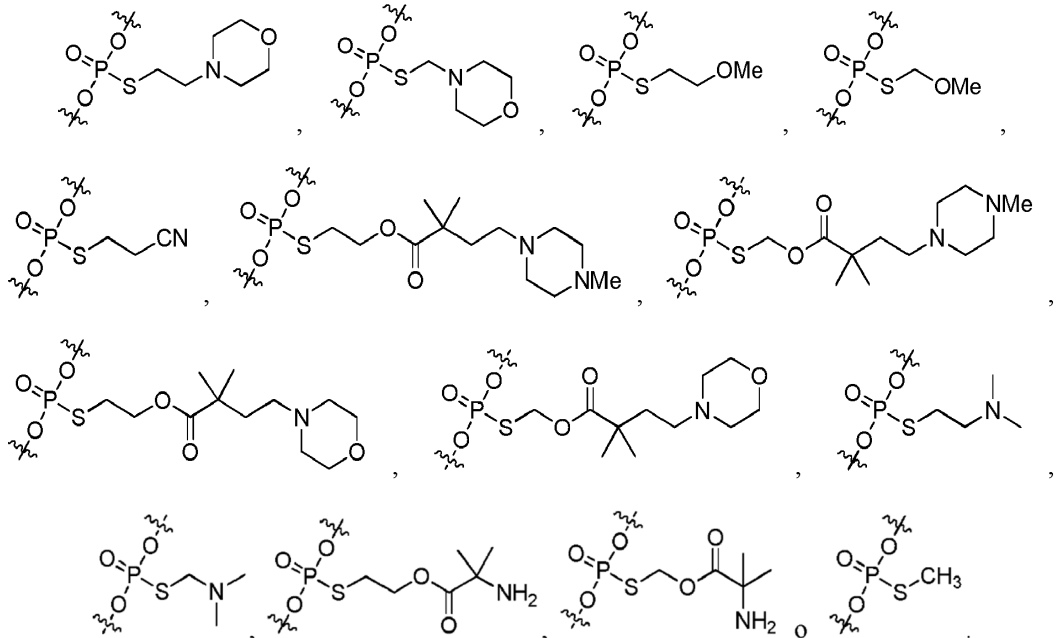
En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico que tiene la estructura de la fórmula I es



10

15

En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico que tiene la estructura de la fórmula I-c es



20

25

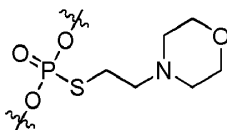
En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más enlaces diéster de fosfato, y uno o más enlaces internucleotídicos modificados que tienen la fórmula de I-a, I-b, o I-c.

30

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de diéster de fosfato y al menos un enlace de triéster de fosforotioato que tiene la estructura de la fórmula I-c. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende al menos un enlace



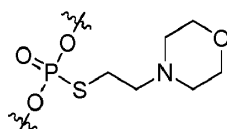
En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una secuencia encontrada en GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico es



5

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una secuencia encontrada en GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico es

10

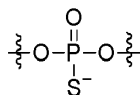


15

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico tiene un fósforo del enlace quiral. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I-c. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I-c. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico es

20

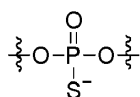
25



30

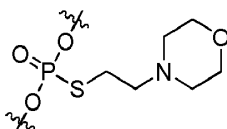
En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico es

35



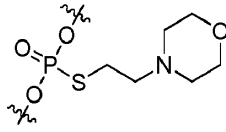
40

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico es

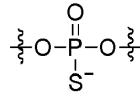


45

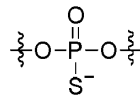
En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico es



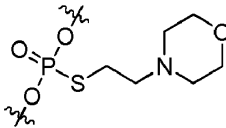
5 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico tiene un fósforo del enlace quiral. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I-c. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico tiene la estructura de la fórmula I-c. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico es



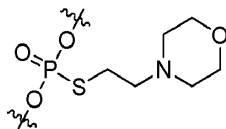
20 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico es



25 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un enlace internucleotídico es



30 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada enlace internucleotídico es



35 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un fósforo del enlace es Rp. Se entiende por un experto habitual en la técnica que en ciertas realizaciones en donde el oligonucleótido quiralmente controlado comprende un ARN secuencia, cada T está independientemente y opcionalmente sustituido con U. La presente divulgación proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada fósforo de enlace es Rp. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos un fósforo del enlace es Sp. La presente divulgación proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada fósforo de enlace es Sp. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un

oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un blockmero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un estereoblockmero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un blockmero con modificación en P. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un blockmero de enlace. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un altmero. La presente divulgación también proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un estereoaltmero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un altmero con modificación en P. La presente divulgación también proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un altmero de enlace. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un unímero. La presente divulgación también proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un estereounímero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un unímero con modificación en P. La presente divulgación también proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un unímero de enlace. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un gápmero. La presente divulgación también proporciona un oligonucleótido quiralmente controlado que tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde el oligonucleótido es un skipmero.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada citosina está opcionalmente e independientemente sustituida con 5-metilcitosina. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde al menos una citosina está opcionalmente e independientemente sustituida con 5-metilcitosina. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de GCCTCAGTCTGCTTCGCACC (SEQ ID NO: 9), en donde cada citosina está opcionalmente e independientemente sustituida con 5-metilcitosina.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se diseña de forma que uno o más nucleótidos comprenden una modificación de fósforo propensa a la "autoliberación" en ciertas condiciones. Es decir, en ciertas condiciones, se diseña una modificación de fósforo particular de forma que se autoescinda del oligonucleótido para proporcionar, por ejemplo, un diéster de fosfato tal como los encontrados en ADN y ARN natural. En algunas realizaciones, dicha modificación de fósforo tiene una estructura de  $-O-L-R^1$ , en donde cada uno de L y  $R^1$  es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un grupo de autoliberación comprende un grupo morfolino. En algunas realizaciones, un grupo de autoliberación se caracteriza por la capacidad para administrar un agente al conector de fósforo internucleotídico, agente que facilita la modificación adicional del átomo de fósforo tal como, por ejemplo, desulfurización. En algunas realizaciones, el agente es agua y la modificación adicional es la hidrólisis para formar un diéster de fosfato, como se encuentra en ADN y ARN natural.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se diseña de forma que las propiedades farmacéuticas resultantes mejoren mediante una o más modificaciones particulares en el fósforo. Está bien documentado en la técnica que ciertos oligonucleótidos son degradados rápidamente por nucleasas y presentan una mala captación celular a través de la membrana celular citoplásmica (Poijarvi-Virta et al., *Curr. Med. Chem.* (2006), 13(28):3441-65; Wagner et al., *Med. Res. Rev.* (2000), 20(6):417-51; Peyrottes et al., *Mini Rev. Med. Chem.* (2004), 4(4):395-408; Gosselin et al., (1996), 43(1):196-208; Bologna et al., (2002), *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 12:33-41). Por ejemplo, Vives et al., (*Nucleic Acids Research* (1999), 27(20):4071-76) encontraron que los pro-oligonucleótidos de terc-butyl SATE presentaron una penetración celular notablemente elevada en comparación con el oligonucleótido parental.

En algunas realizaciones, una modificación en un fósforo del enlace se caracteriza por su capacidad para ser transformado en un diéster de fosfato, tal como los presentes en el ADN y ARN natural, por una o más enzimas esterazas, nucleasas y/o citocromo P450, que incluyen, pero no se limitan a, las enumeradas en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Enzimas a modo de ejemplo.

Familia	Gen
CYP1	CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1
CYP2	CYP2A6, CYP2A7, CYP2A13, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, CYP2F1, CYP2J2, CYP2R1, CYP2S1, CYP2U1, CYP2W1
CYP3	CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP3A43
CYP4	CYP4A11, CYP4A22, CYP4B1, CYP4F2, CYP4F3, CYP4F8, CYP4F11, CYP4F12, CYP4F22, CYP4V2, CYP4X1, CYP4Z1
CYP5	CYP5A1
CYP7	CYP7A1, CYP7B1
CYP8	CYP8A1 (prostaciclina sintasa), CYP8B1 (biosíntesis de ácidos biliares)
CYP11	CYP11A1, CYP11B1, CYP11B2
CYP17	CYP17A1
CYP19	CYP19A1
CYP20	CYP20A1
CYP21	CYP21A2
CYP24	CYP24A1
CYP26	CYP26A1, CYP26B1, CYP26C1
CYP27	CYP27A1 (biosíntesis de ácidos biliares), CYP27B1 (vitamina D3 1-alfa hidroxilasa, activa la vitamina D3), CYP27C1 (función desconocida)
CYP39	CYP39A1
CYP46	CYP46A1
CYP51	CYP51A1 (lanosterol 14-alfa desmetilasa)

5 En algunas realizaciones, una modificación en el fósforo produce un resto de modificación en P caracterizado porque actúa de profármaco, por ejemplo, el resto de modificación en P facilita la administración de un oligonucleótido a una localización deseada antes de la retirada. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de modificación en P resulta de la PEGilación en el fósforo del enlace. Un experto en las técnicas relevantes apreciará que las diversas longitudes de cadena de PEG son útiles y que la selección de la longitud de cadena será determinada en parte por el resultado que se busca lograr por la PEGilación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la PEGilación se efectúa para reducir la captación de RES y prolongar la vida útil en circulación *in vivo* de un oligonucleótido.

10 En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación para su uso según la presente invención es de un peso molecular de aproximadamente 300 g/mol a aproximadamente 100.000 g/mol. En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación es de un peso molecular de aproximadamente 300 g/mol a aproximadamente 10.000 g/mol. En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación es de un peso molecular de aproximadamente 300 g/mol a aproximadamente 5.000 g/mol. En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación es de un peso molecular de aproximadamente 500 g/mol. En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación es de un peso molecular de aproximadamente 1000 g/mol. En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación es de un peso molecular de aproximadamente 3000 g/mol. En algunas realizaciones, un reactivo de PEGilación es de un peso molecular de aproximadamente 5000 g/mol.

15 En ciertas realizaciones, un reactivo de PEGilación es PEG500. En ciertas realizaciones, un reactivo de PEGilación es PEG1000. En ciertas realizaciones, un reactivo de PEGilación es PEG3000. En ciertas realizaciones, un reactivo de PEGilación es PEG5000.

20 En algunas realizaciones, un resto de modificación en P se caracteriza porque actúa como un potenciador de PK, por ejemplo, lípidos, lípidos PEGilados, etc.

25 En algunas realizaciones, un resto de modificación en P se caracteriza porque actúa de agente que promueve la entrada celular y/o el escape endosómico, tal como un lípido o péptido perturbador de la membrana.

30 En algunas realizaciones, un resto de modificación en P se caracteriza porque actúa como un agente de direccionamiento. En algunas realizaciones, un resto de modificación en P es o comprende un agente de

direccionamiento. La expresión "agente de direccionamiento", como se usa en el presente documento, es una entidad que se asocia con una carga de interés (por ejemplo, con un oligonucleótido o composición de oligonucleótido) y también interactúa con un sitio diana de interés de manera que la carga de interés sea dirigida al sitio diana de interés cuando se asocia al agente de direccionamiento a un grado materialmente mayor que el observado en condiciones por lo demás comparables cuando la carga de interés no está asociada con el agente de direccionamiento. Un agente de direccionamiento puede ser, o comprender, cualquiera de una variedad de restos químicos, que incluyen, por ejemplo, restos de molécula pequeña, ácidos nucleicos, polipéptidos, hidratos de carbono, etc. Los agentes de direccionamiento se describen además por Adarsh et al., "Organelle Specific Targeted Drug Delivery - A Review," International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 2011, p. 895.

A modo de ejemplo, dichos agentes de direccionamiento incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, transferrina), oligopéptidos (por ejemplo, oligopéptidos cíclicos y que contienen RGD acíclico), anticuerpos (anticuerpos monoclonales y policlonales, por ejemplo, anticuerpos IgG, IgA, IgM, IgD, IgE), azúcares / hidratos de carbono (por ejemplo, monosacáridos y/u oligosacáridos (manosa, manosa-6-fosfato, galactosa y similares)), vitaminas (por ejemplo, folato), u otras biomoléculas pequeñas. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es una molécula esteroidea (por ejemplo, ácidos biliares que incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido deshidrocólico; cortisona; digoxigenina; testosterona; colesterol; esteroides catiónicos, tales como cortisona que tiene un grupo trimetilaminometilhidrazida unido por un doble enlace en la posición 3 del anillo de cortisona, etc.). En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es una molécula lipófila (por ejemplo, hidrocarburos alicíclicos, ácidos grasos saturados e insaturados, ceras, terpenos e hidrocarburos polialicíclicos, tales como adamantina y buckminsterfullerenos). En algunas realizaciones, una molécula lipófila es un terpenoide, tal como vitamina A, ácido retinoico, retinal o deshidrorretinal. En algunas realizaciones, un resto de direccionamiento es un péptido.

En algunas realizaciones, un resto de modificación en P es un agente de direccionamiento de la fórmula -X-L-R<sup>1</sup>, en donde cada uno de X, L y R<sup>1</sup> son como se definen en la fórmula I anterior.

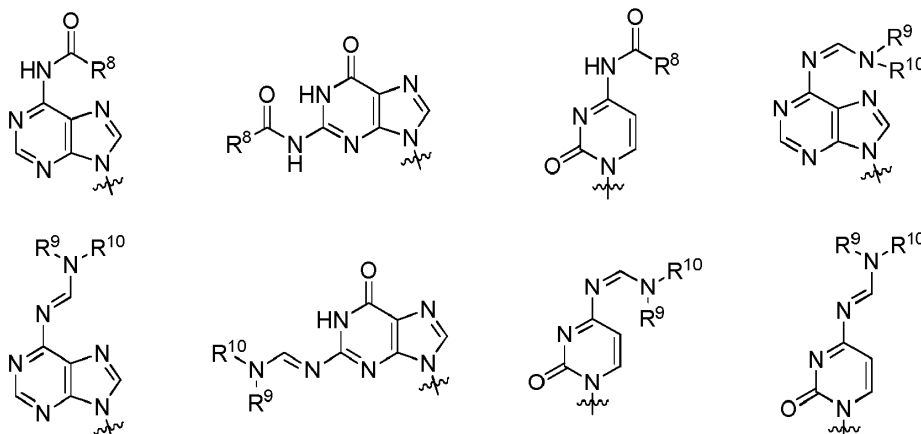
En algunas realizaciones, un resto de modificación en P se caracteriza porque facilita la administración específica de célula.

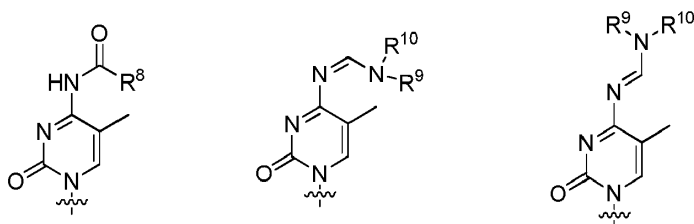
En algunas realizaciones, un resto de modificación en P se caracteriza porque se clasifica en una o más de las categorías anteriormente descritas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un resto de modificación en P actúa de potenciador de PK y de ligando de direccionamiento. En algunas realizaciones, un resto de modificación en P actúa de profármaco y de agente de escape endosómico. Un experto en las técnicas relevantes reconocería que son posibles numerosas de otras combinaciones y se contemplan por la presente invención.

### Nucleobases

En algunas realizaciones, una nucleobase presente en un oligonucleótido proporcionado tiene una nucleobase natural o una nucleobase modificada derivada de una nucleobase natural. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, uracilo, timina, adenina, citosina y guanina que tienen sus grupos amino respectivos protegidos por grupos protectores acilo, 2-fluorouracilo, 2-fluorocitosina, 5-bromouracilo, 5-yodouracilo, 2,6-diaminopurina, azacitosina, análogos de pirimidina, tales como pseudoisocitosina y pseudouracilo, y otras nucleobases modificadas, tales como purinas sustituidas en 8, xantina, o hipoxantina (siendo las dos últimas los productos de degradación natural). Las nucleobases modificadas a modo de ejemplo se desvelan en Chiu and Rana, RNA, 2003, 9, 1034-1048, Limbach et al. Nucleic Acids Research, 1994, 22, 2183-2196 y Revankar y Rao, Comprehensive Natural Products Chemistry, vol. 7, 313.

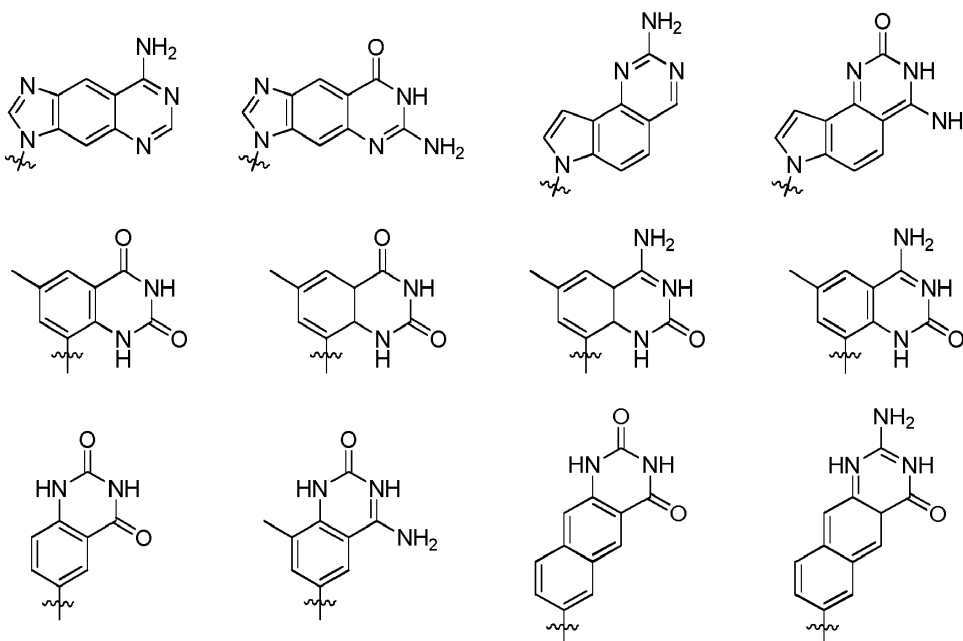
Los compuestos representados por las siguientes fórmulas generales también se contemplan como nucleobases modificadas:





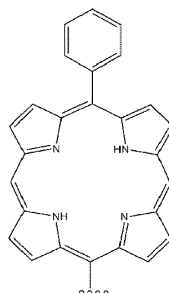
5 en donde  $R^8$  es un grupo opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, seleccionado de un grupo alifático, arilo, aralquilo, ariloxilalquilo, carbociclilo, heterociclilo o heteroarilo que tiene 1 a 15 átomos de carbono, que incluye, a modo de ejemplo solo, un grupo metilo, isopropilo, fenilo, bencilo o fenoximetilo; y cada uno de  $R^9$  y  $R^{10}$  es independientemente un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático, carbociclilo, arilo, heterociclilo y heteroarilo lineal o ramificado.

10 Las nucleobases modificadas también incluyen nucleobases de tamaño expandido en las que se han añadido uno o más anillos de arilo, tales como los anillos de fenilo. Se contempla que las sustituciones de bases nucleicas descritas en el catálogo de Glen Research ([www.glenresearch.com](http://www.glenresearch.com)); Krueger AT et al., *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40, 141-150; Kool, ET, *Acc. Chem. Res.*, 2002, 35, 936-943; Benner S.A., et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2005, 6, 553-543; Romesberg, F.E., et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7, 723-733; Hirao, I., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, 10, 622-627, son útiles para la síntesis de los ácidos nucleicos descritos en el presente documento Algunos ejemplos de estas nucleobases de tamaño expandido se muestran a continuación:



20

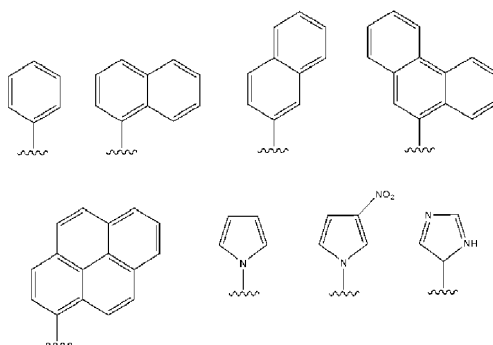
25 En el presente documento, las nucleobases modificadas también engloban estructuras que no son consideradas nucleobases, sino que son otros restos tales como, pero no se limitan a, anillos derivados de corrina o porfirina. Las sustituciones de bases derivadas de porfirina se han descrito en Morales-Rojas, H y Kool, ET, *Org. Lett.*, 2002, 4, 4377-4380. A continuación se muestra un ejemplo de un anillo derivado de porfirina que se puede usar como una sustitución de base:



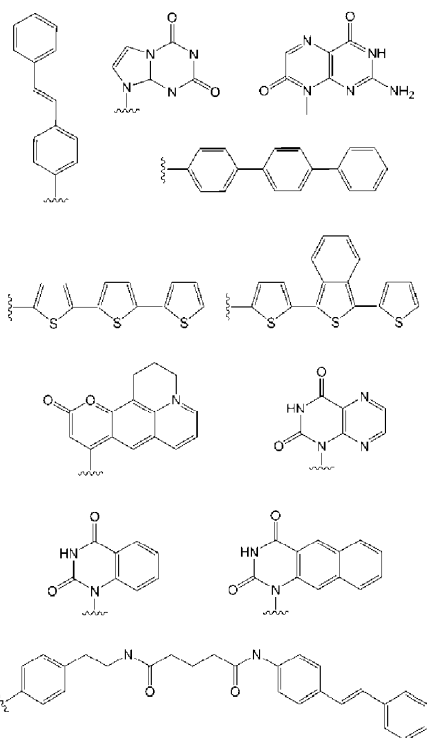
30



En algunas realizaciones, las nucleobases modificadas son de una cualquiera de las siguientes estructuras, opcionalmente sustituidas:



En algunas realizaciones, una nucleobase modificada es fluorescente. A modo de ejemplo, dichas nucleobases modificadas fluorescentes incluyen fenantreno, pireno, estilbeno, isoxantina, isozantopterina, terfenilo, tertiofeno, benzotertiofeno, coumarina, lumazina, estilbeno unido, benzo-uracilo y nafto-uracilo, como se muestra a continuación:



En algunas realizaciones, una nucleobase modificada está sin sustituir. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada está sustituida. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada está sustituida de forma que contenga, por ejemplo, heteroátomos, grupos alquilo o restos de unión conectados a restos fluorescentes, biotina o restos de avidina, u otra proteína o péptidos. En algunas realizaciones, una nucleobase modificada es una "base universal" que no es una nucleobase en el sentido más clásico, pero que funciona similarmente a una nucleobase. Un ejemplo representativo de dicha base universal es 3-nitropirrol.

En algunas realizaciones, también se pueden usar otros nucleósidos en el proceso desvelado en el presente documento e incluyen nucleósidos que incorporan nucleobases modificadas, o nucleobases covalentemente unidas a azúcares modificados. Algunos ejemplos de nucleósidos que incorporan nucleobases modificadas incluyen 4-acetilcitidina; 5-(carboxihidroximetil)uridina; 2'-O-metilcitidina; 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina; 5-carboximetilaminometiluridina; dihidrouridina; 2'-O-metilpseudouridina; beta,D-galactosilqueosina; 2'-O-metilguanosina; N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina; 1-metiladenosina; 1-metilpseudouridina; 1-metilguanosina; 1-metilinosina; 2,2-dimetilguanosina; 2-metiladenosina; 2-metilguanosina; N<sup>7</sup>-metilguanosina; 3-metil-citidina; 5-metilcitidina; 5-hidroximetilcitidina; 5-formilcitosina; 5-carboxilcitosina; N<sup>6</sup>-metiladenosina; 7-metilguanosina; 5-metilaminoetiluridina; 5-metoxiaminometil-2-tiouridina; beta,D-manosilqueosina; 5-metoxycarbonilmetiluridina; 5-metoxiuridina; 2-metilio-N<sup>6</sup>-isopenteniladenosina; N-((9-beta,D-ribofuranosil-2-metilpurina-6-il)carbamoil)treonina; N-((9-beta,D-ribofuranosilpurina-6-il)-N-metilcarbamoil)treonina; éster metílico de ácido uridina-5-oxiacético; ácido uridina-5-

oxiacético (v); pseudouridina; queosina; 2-tiocitidina; 5-metil-2-tiouridina; 2-tiouridina; 4-tiouridina; 5-metiluridina; 2'-O-metil-5-metiluridina; y 2'-O-metiluridina.

5 En algunas realizaciones, los nucleósidos incluyen análogos de nucleósidos bicíclicos modificados en 6' que tienen quiralidad (R) o (S) en la posición 6' e incluyen los análogos descritos en la patente de EE. UU. N.º 7.399.845. En otras realizaciones, los nucleósidos incluyen análogos de nucleósidos bicíclicos modificados en 5' que tienen quiralidad (R) o (S) en la posición 5' e incluyen los análogos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. N.º 20070287831.

10 En algunas realizaciones, una nucleobase o nucleobase modificada comprende uno o más restos de unión a biomoléculas, tales como, por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, biotina, avidina, estreptavidina, ligandos de receptor o restos quelantes. En otras realizaciones, una nucleobase o nucleobase modificada es 5-bromouracilo, 5-yodouracilo o 2,6-diaminopurina. En algunas realizaciones, una nucleobase o nucleobase modificada se modifica por sustitución con un resto fluorescente o de unión a biomolécula. En algunas realizaciones, el  
15 sustituyente en una nucleobase o nucleobase modificada es un resto fluorescente. En algunas realizaciones, el sustituyente en una nucleobase o nucleobase modificada es biotina o avidina.

Las patentes de EE. UU. representativas que enseñan la preparación de ciertas de las nucleobases modificadas anteriormente indicadas, así como otras nucleobases modificadas, incluyen, pero no se limitan a, la patente de EE. UU. anteriormente indicada N.º 3.687.808, así como las patentes de EE. UU. N.º 4.845.205; 5.130.30; 5.134.066; 20 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.457.191; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121. 5.596.091; 5.614.617; 5.681.941; 5.750.692; 6.015.886; 6.147.200; 6.166.197; 6.222.025; 6.235.887; 6.380.368; 6.528.640; 6.639.062; 6.617.438; 7.045.610; 7.427.672; y 7.495.088, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad.

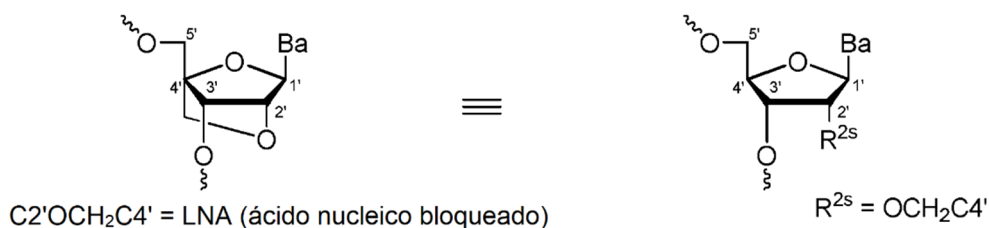
## 25 **Azúcares**

Los nucleótidos naturales más comunes comprenden azúcares de ribosa unidos a las nucleobases adenosina (A), citosina (C), guanina (G) y timina (T), o uracilo (U). También se contemplan nucleótidos modificados, en donde un  
30 grupo fosfato o fósforo del enlace en los nucleótidos se puede unir a diversas posiciones de un azúcar o azúcar modificado. Como ejemplos no limitantes, el grupo fosfato o fósforo del enlace se puede unir al resto 2', 3', 4' o 5' hidroxilo de un azúcar o azúcar modificado. También se contemplan en este contexto nucleótidos que incorporan nucleobases modificadas como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, los nucleótidos o nucleótidos modificados que comprenden un resto -OH sin proteger se usan según métodos de la presente invención.

También se pueden incorporar otros azúcares modificados dentro de un oligonucleótido proporcionado. En algunas realizaciones, un azúcar modificado contiene uno o más sustituyentes en la posición 2', que incluyen uno de los  
35 siguientes: -F; -CF<sub>3</sub>, -CN, -N<sub>3</sub>, -NO, -NO<sub>2</sub>, -OR', -SR' o -N(R')<sub>2</sub>, en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -S-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -NH-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>; -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -S-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -NH-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>; -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -S-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -NH-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>; o -O-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -O-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-NH-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -O-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>, -NH-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), en donde el alquilo, alquilen, alquenilo y alquinilo pueden estar sustituidos o sin sustituir. Los ejemplos de sustituyentes incluyen, y no se limitan a,  
45 -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub> y -O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, en donde n es desde 1 hasta aproximadamente 10, MOE, DMAOE, DMAEOE. También se contemplan en el presente documento los azúcares modificados descritos en el documento de patente WO 2001/088198; y Martin et al., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504. En algunas realizaciones, un azúcar modificado comprende uno o más grupos seleccionados de un grupo sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, una marca fluorescente, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ácido nucleico, un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un ácido nucleico, u otros sustituyentes  
50 que tienen propiedades similares. En algunas realizaciones, las modificaciones se hacen en una o más de las posiciones 2', 3', 4', 5' o 6' del azúcar o azúcar modificado, que incluyen la posición 3' del azúcar en el nucleótido 3'-terminal o en la posición 5' del nucleótido 5'-terminal.

55 En algunas realizaciones, el 2'-OH de una ribosa se sustituye con un sustituyente que incluye uno de los siguientes: -H, -F; -CF<sub>3</sub>, -CN, -N<sub>3</sub>, -NO, -NO<sub>2</sub>, -OR', -SR', o -N(R')<sub>2</sub>, en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento; -O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -S-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -NH-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), o -N(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>; -O-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -S-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -NH-(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquenilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>; -O-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -S-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>), -NH-(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquinilo C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>; o -O-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), -O-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-NH-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -O-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-NH(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)<sub>2</sub>, -NH-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) o -N(alquil C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-(alquilen C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)-O-(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>), en donde el alquilo, alquilen, alquenilo y alquinilo puede estar sustituido o sin sustituir. En algunas realizaciones, el 2'-OH se sustituye por -H (desoxirribosa). En algunas realizaciones, el 2'-OH se sustituye por -F. En algunas realizaciones, el 2'-OH se sustituye por -OR'. En algunas realizaciones, el 2'-OH se sustituye por -OMe. En algunas realizaciones, el 2'-OH se sustituye por -OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OMe.  
65

Los azúcares modificados también incluyen ácidos nucleicos bloqueados (LNA). En algunas realizaciones, dos sustituyentes en los átomos de carbono del azúcar se toman conjuntamente para formar un resto bivalente. En algunas realizaciones, dos sustituyentes están en dos átomos de carbono del azúcar diferentes. En algunas realizaciones, un resto bivalente formado tiene la estructura de -L- como se define en el presente documento. En algunas realizaciones, -L- es -O-CH<sub>2</sub>-, en donde -CH<sub>2</sub>- está opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, -L- es -O-CH<sub>2</sub>-. En algunas realizaciones, -L- es -O-CH(Et)-. En algunas realizaciones, -L- está entre C2 y C4 de un resto de azúcar. En algunas realizaciones, un ácido nucleico bloqueado tiene la estructura indicada a continuación. Se indica un ácido nucleico bloqueado de la estructura a continuación, en donde Ba representa una nucleobase o nucleobase modificada como se describe en el presente documento, y en donde R<sup>2s</sup> es -OCH<sub>2</sub>C4'.

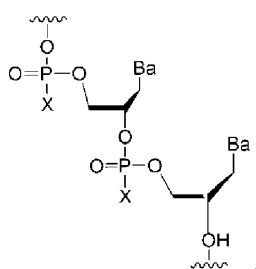


C2'OCH<sub>2</sub>C4' = LNA (ácido nucleico bloqueado) R<sup>2s</sup> = OCH<sub>2</sub>C4'

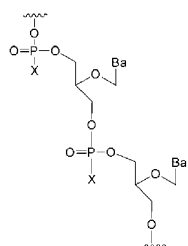
15 En algunas realizaciones, un azúcar modificado es un ENA, tal como los descritos en, por ejemplo, Seth et al., J Am Chem Soc. 27 de octubre de 2010; 132(42): 14942-1495. En algunas realizaciones, un azúcar modificado es cualquiera de los encontrados en un XNA (ácido xenonucleico), por ejemplo, arabinosa, anhidrohexitol, treosa, 2'fluoroarabinosa o ciclohexeno.

20 Los azúcares modificados incluyen miméticos de azúcar, tales como restos de ciclobutilo o ciclopentilo en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de dichas estructuras de azúcar modificado incluyen, pero no se limitan a, las patentes de EE. UU. N.º 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; y 5.359.044. Algunos azúcares modificados que se contemplan incluyen azúcares en los que el átomo de oxígeno dentro del anillo de ribosa está sustituido con nitrógeno, azufre, selenio o carbono. En algunas realizaciones, un azúcar modificado es una ribosa modificada, en donde el átomo de oxígeno dentro del anillo de ribosa está sustituido con nitrógeno, y en donde el nitrógeno está opcionalmente sustituido con un grupo alquilo (por ejemplo, metilo, etilo, isopropilo, etc.).

30 Los ejemplos no limitantes de azúcares modificados incluyen glicerol, que forma análogos de ácido nucleico de glicerol (GNA). Un ejemplo de un análogo de GNA se muestra a continuación y se describe en Zhang, R et al., J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 5846-5847; Zhang L, et al., J. Am. Chem. Soc., 2005, 127, 4174-4175 y Tsai CH et al., PNAS, 2007, 14598-14603 (X = O<sup>-</sup>):

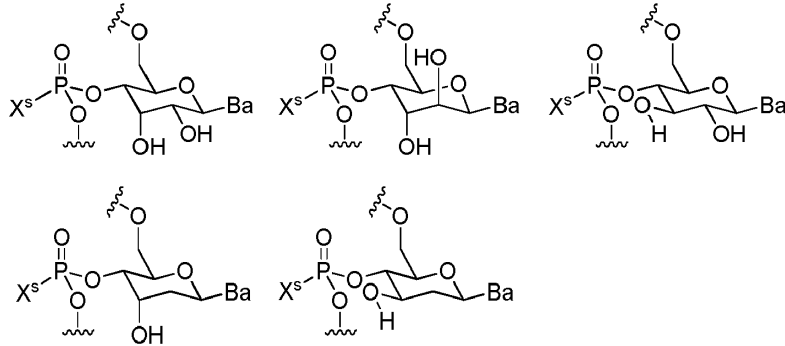


Otro ejemplo de un análogo derivado de GNA, el ácido nucleico flexible (FNA) basado el acetal aminal mixto de formil glicerol, se describe en Joyce GF et al., PNAS, 1987, 84, 4398-4402 y Heuberger BD y Switzer C, J. Am. Chem. Soc., 2008, 130, 412-413, y se muestra a continuación:



Ejemplos adicionales no limitantes de azúcares modificados incluyen azúcares de hexopiranosilo (6' a 4'), pentopiranosilo (4' a 2'), pentopiranosilo (4' a 3') o tetrafuranosilo (3' a 2'). En algunas realizaciones, un azúcar de hexopiranosilo (6' a 4') es de una cualquiera en las siguientes fórmulas:

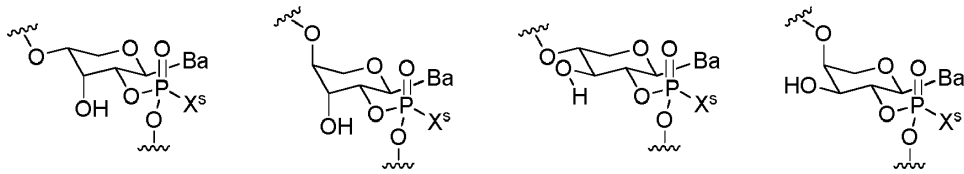
5



10 en donde X<sup>s</sup> corresponde al grupo de modificación en P "-XLR<sup>1</sup>" descrito en el presente documento y Ba es como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, un azúcar de pentopiranosilo (4' a 2') es de una cualquiera en las siguientes fórmulas:

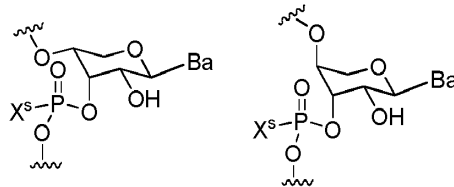
15



en donde X<sup>s</sup> corresponde al grupo de modificación en P "-XLR<sup>1</sup>" descrito en el presente documento y Ba es como se define en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, un azúcar de pentopiranosilo (4' a 3') es de una cualquiera en las siguientes fórmulas:

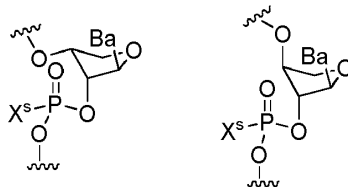
25



en donde X<sup>s</sup> corresponde al grupo de modificación en P "-XLR<sup>1</sup>" descrito en el presente documento y Ba es como se define en el presente documento.

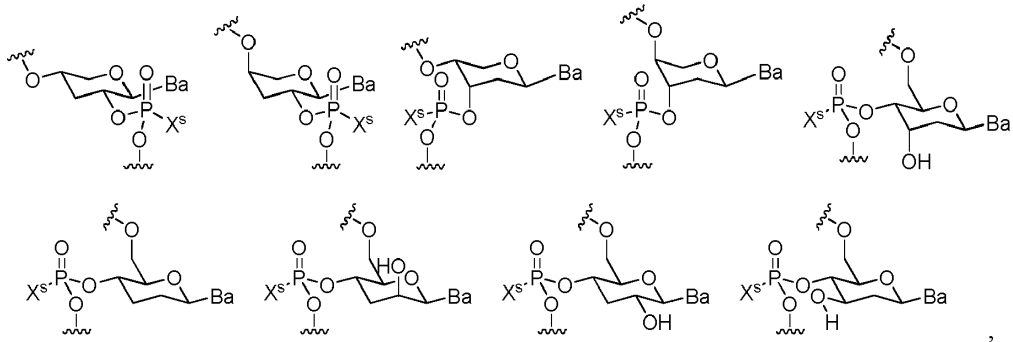
En algunas realizaciones, un azúcar de tetrafuranosilo (3' a 2') es de cualquiera de las siguientes fórmulas:

30



en donde X<sup>s</sup> corresponde al grupo de modificación en P "-XLR<sup>1</sup>" descrito en el presente documento y Ba es como se define en el presente documento.

En algunas realizaciones, un azúcar modificado es de una cualquiera en las siguientes fórmulas:

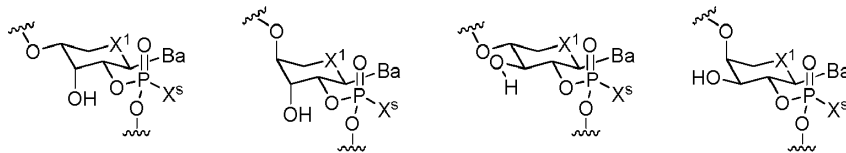
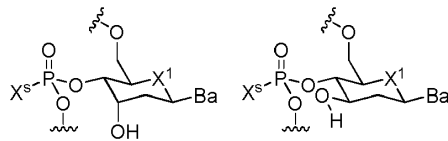
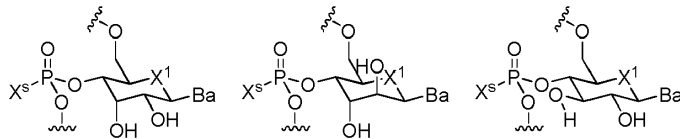


5 en donde X<sup>s</sup> corresponde al grupo de modificación en P "-XLR<sup>1</sup>" descrito en el presente documento y Ba es como se define en el presente documento.

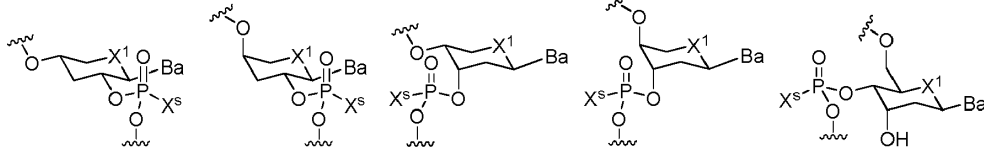
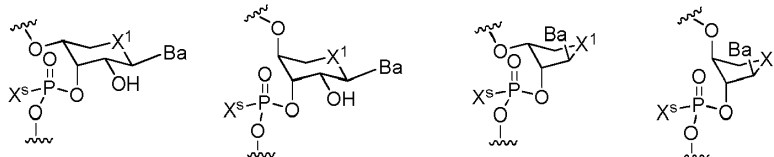
En algunas realizaciones, uno o más grupos hidroxilo en un resto de azúcar están opcionalmente e independientemente sustituidos con halógeno, R' -N(R')<sub>2</sub>, -OR' o -SR', en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

En algunas realizaciones, un mimético de azúcar es como se ilustra a continuación, en donde X<sup>s</sup> corresponde al grupo de modificación en P "-XLR<sup>1</sup>" descrito en el presente documento, Ba es como se define en el presente documento y X<sup>1</sup> se selecciona de -S-, -Se-, -CH<sub>2</sub>-, -NMe-, -NEt- o -N<sup>i</sup>Pr-.

15



20



25

En algunas realizaciones, se modifican al menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50% o más (por ejemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más), ambos incluidos, de los azúcares en una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados. En algunas realizaciones, solo se modifican los restos de purina (se

30

modifican, por ejemplo, aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50% o más [por ejemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más] de los restos de purina). En algunas realizaciones, solo se modifican restos de pirimidina (por ejemplo, se modifican aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50% o más [por ejemplo, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más] de los restos de pirimidina). En algunas realizaciones, se modifican tanto los restos de purina como de pirimidina.

Los azúcares modificados y miméticos de azúcar se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a: A. Eschenmoser, *Science* (1999), 284:2118; M. Bohringer et al., *Helv. Chim. Acta* (1992), 75:1416-1477; M. Egli et al, *J. Am. Chem. Soc.* (2006), 128(33):10847-56; A. Eschenmoser en *Chemical Synthesis: Gnosis to Prognosis*, C. Chatgililoglu y V. Sniekus, Ed., (Kluwer Academic, Netherlands, 1996), p.293; K.-U. Schoning et al., *Science* (2000), 290:1347-1351; A. Eschenmoser et al., *Helv. Chim. Acta* (1992), 75:218; J. Hunziker et al., *Helv. Chim. Acta* (1993), 76:259; G. Otting et al., *Helv. Chim. Acta* (1993), 76:2701; K. Groebke et al., *Helv. Chim. Acta* (1998), 81:375; y A. Eschenmoser, *Science* (1999), 284:2118. Las modificaciones a las modificaciones en 2' se pueden encontrar en Verma, S. et al. *Annu. Rev. Biochem.* 1998, 67, 99-134 y todas las referencias en su interior. Modificaciones específicas a la ribosa se pueden encontrar en las siguientes referencias: 2'-flúor (Kawasaki et. al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831- 841), 2'-MOE (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, *J. Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 301-310). En algunas realizaciones, un azúcar modificado es cualquiera de aquellos descritos en la publicación PCT N.º WO2012/030683, incorporada en el presente documento como referencia, y representada en las Figuras 26-30 de la presente solicitud.

### ***Oligonucleótidos***

La presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos que están quiralmente controlados. Por ejemplo, en algunas realizaciones, una composición proporcionada contiene niveles predeterminados de uno o más tipos de oligonucleótidos individuales, en donde un tipo de oligonucleótido se define por: 1) la secuencia de bases; 2) el patrón de enlaces del esqueleto; 3) el patrón de centros quirales del esqueleto; y 4) patrón de modificaciones en P del esqueleto.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido proporcionado es un unímero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido proporcionado es un unímero de modificación en P. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado es un estereounímero. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado es un estereounímero de configuración Rp. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado es un estereounímero de configuración Sp.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido proporcionado es un altmero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un blockmero con modificación en P. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado es un estereounímero.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un blockmero. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un blockmero con modificación en P. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un estereoblockmero.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un gápmero.

En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado es un skipmero.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un hemímero. En algunas realizaciones, un hemímero es un oligonucleótido en donde el extremo 5' o el extremo 3' tiene una secuencia que posee una característica estructural que no tiene el resto del oligonucleótido. En algunas realizaciones, el extremo 5' o el extremo 3' tiene o comprende 2 a 20 nucleótidos. En algunas realizaciones, una característica estructural es una modificación de base. En algunas realizaciones, una característica estructural es una modificación de azúcar. En algunas realizaciones, una característica estructural es una modificación en P. En algunas realizaciones, una característica estructural es la estereoquímica del enlace internucleotídico quiral. En algunas realizaciones, una característica estructural es o comprende una modificación de base, una modificación de azúcar, una modificación en P, o estereoquímica del enlace internucleotídico quiral, o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un hemímero es un oligonucleótido en el que cada resto de azúcar de la secuencia del extremo 5' comparte una modificación común. En algunas realizaciones, un hemímero es un oligonucleótido en el que

5 cada resto de azúcar de la secuencia del extremo 3' comparte una modificación común. En algunas realizaciones, una modificación de azúcar común de la secuencia del extremo 5' o extremo 3' no es compartida por ningún otro resto de azúcar en el oligonucleótido. En algunas realizaciones, un hemímero a modo de ejemplo es un oligonucleótido que comprende una secuencia de nucleósidos modificados en el azúcar de 2'-O-alquilo sustituido o sin sustituir, nucleósidos modificados en el azúcar bicíclico,  $\beta$ -D-ribonucleósidos o  $\beta$ -D-desoxirribonucleósidos (por ejemplo, nucleósidos modificados con 2'-MOE y nucleósidos modificados en el azúcar bicíclico LNA™ o ENA™) en un extremo y una secuencia de nucleósidos con un resto de azúcar diferente (tal como nucleósidos modificados en el azúcar de 2'-O-alquilo sustituido o sin sustituir, nucleósidos modificados en el azúcar bicíclico o naturales) en el otro extremo. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado es una combinación de uno o más de unímero, altmero, blockmero, gápmero, hemímero y skipmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado es una combinación de uno o más de unímero, altmero, blockmero, gápmero y skipmero. Por ejemplo, en algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado tiene tanto un altmero como un gápmero. En algunas realizaciones, un nucleótido proporcionado es tanto un gápmero como un skipmero. Un experto en las técnicas químicas y sintéticas reconocerá que están disponibles numerosas otras combinaciones de patrones y están limitadas solo por la disponibilidad comercial y / o accesibilidad sintética de las partes constituyentes requeridas para sintetizar un oligonucleótido proporcionado según los métodos de la presente invención. En algunas realizaciones, una estructura de hemímero proporciona beneficios ventajosos, como se ejemplifica por la Figura 29. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados son 5'-hemímeros que comprenden restos de azúcar modificados en una secuencia del extremo 5'. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos proporcionados son 5'-hemímeros que comprenden restos de azúcar en 2' modificados en una secuencia del extremo 5'.

25 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más nucleótidos opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más nucleótidos modificados. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más nucleósidos opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más nucleósidos modificados. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más LNA opcionalmente sustituidos.

35 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más nucleobases opcionalmente sustituidas. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más nucleobases naturales opcionalmente sustituidas. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más nucleobases modificadas opcionalmente sustituidas. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más 5-metilcitosinas; 5-hidroximetilcitosinas, 5-formilcitosinas o 5-carboxilcitosinas. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más 5-metilcitosinas.

45 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más azúcares opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende uno o más azúcares opcionalmente sustituidos encontrados en ADN y ARN natural. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más ribosas o desoxirribosas opcionalmente sustituidas. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más ribosas o desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde uno o más grupos hidroxilo del resto de ribosa o desoxirribosa están opcionalmente e independientemente sustituidos con halógeno, R', -N(R')<sub>2</sub>, -OR' o -SR', en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con halógeno, R', -N(R')<sub>2</sub>, -OR' o -SR', en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con halógeno. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con uno o más -F, halógeno. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con -OR', en donde cada R' es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente

controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con -OR', en donde cada R' es independientemente un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con -OR', en donde cada R' es independientemente un alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con -OMe. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende una o más desoxirribosas opcionalmente sustituidas, en donde la posición 2' de la desoxirribosa está opcionalmente e independientemente sustituida con -O-metoxietilo.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene oligonucleótido monocatenario.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene una cadena de oligonucleótidos hibridada. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene una cadena de oligonucleótidos parcialmente hibridada. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene una cadena de oligonucleótidos completamente hibridada. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un oligonucleótido bicatenario. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un oligonucleótido tricatenario (por ejemplo, un tríplex).

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es quimérico. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene quimera de ADN-ARN, quimera de ADN-LNA, etc.

En algunos aspectos, una cualquiera de las estructuras que comprenden un oligonucleótido representado en el documento de patente WO2012/030683 se puede modificar según los métodos de la presente divulgación para proporcionar variantes quiralmente controladas de los mismos. Por ejemplo, en algunos aspectos, las variantes quiralmente controladas comprenden una modificación estereoquímica en uno cualquiera o más del fósforo del enlace y/o una modificación en P en uno cualquiera o más del fósforo del enlace. Por ejemplo, en algunos aspectos, una unidad de nucleótido particular de un oligonucleótido del documento de patente WO2012/030683 se preselecciona para ser estereoquímicamente modificado en el fósforo del enlace de esa unidad de nucleótido y/o modificado en P en el fósforo del enlace de esa unidad de nucleótido. En algunos aspectos, un oligonucleótido quiralmente controlado tiene una cualquiera de las estructuras representadas en las Figuras 26-30. En algunos aspectos, un oligonucleótido quiralmente controlado es una variante (por ejemplo, versión modificada) de una cualquiera de las estructuras representadas en las Figuras 26-30.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un agente terapéutico.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un oligonucleótido antisentido.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un oligonucleótido antigénico.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un oligonucleótido señuelo.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es parte de una vacuna de ADN.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un oligonucleótido inmunomodulador, por ejemplo, oligonucleótido inmunoestimulante y oligonucleótido inmunoinhibidor.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un adyuvante.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un aptámero.



En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es una ribozima.

5 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene una desoxirribozima (ADNzimas o enzimas de ADN).

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un ARNip.

10 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un microARN o miARN.

15 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un ARNnc (ARN no codificantes), que incluye un ARN no codificante largo (ARNncl) y un ARN no codificante pequeño, tal como ARN que interactúa con piwi (ARNpi).

20 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es complementario a un ARN estructural, por ejemplo, ARNt.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido es un análogo de ácido nucleico, por ejemplo, GNA, LNA, PNA, TNA y morfolino.

25 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un fármaco modificado en P.

30 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene un cebador. En algunas realizaciones, un cebador es para su uso en las reacciones en cadena de la polimerasa (es decir, PCR) para amplificar ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, un cebador es para su uso en cualquier variación conocida de PCR, tal como PCR con transcripción inversa (RT-PCR) y PCR en tiempo real.

35 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido se caracteriza por tener la capacidad de modular la activación de RNasa H. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la activación de RNasa H se modula por la presencia de análogos de ácidos nucleicos de fosforotioato estereocontrolados, siendo el ADN/ARN natural más o igualmente susceptible que el estereoisómero *Rp*, que a su vez es más susceptible que el estereoisómero *Sp* correspondiente.

40 En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido se caracteriza por tener la capacidad de aumentar o disminuir indirecta o directamente la actividad de una proteína o inhibición o promoción de la expresión de una proteína. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados de la presente invención, un oligonucleótido se caracteriza porque es útil en el control de la proliferación celular, replicación vírica y/o cualquier otro proceso de señalización de células.

45 En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 200 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 180 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 160 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 140 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 120 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 100 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 90 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 80 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 70 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 60 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 50 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 40 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 30 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 29 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 28 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 27 unidades de nucleótidos de longitud. En algunos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 26 unidades de nucleótidos



oligonucleótido tiene al menos 17 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 18 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 19 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 20 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 21 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 22 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 23 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 24 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 25 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene al menos 30 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene un dúplex de cadenas complementarias de al menos 18 unidades de nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el oligonucleótido tiene un dúplex de cadenas complementarias de al menos 21 unidades de nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el extremo 5' y/o el extremo 3' de un oligonucleótido se modifica. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, el extremo 5' y/o el extremo 3' de un oligonucleótido se modifica con un resto de terminación terminal. Dichas modificaciones a modo de ejemplo, que incluyen restos de terminación terminal, se describen ampliamente en el presente documento y en la técnica, por ejemplo, pero no se limitan a las descritas en la publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2009/0023675A1.

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, los oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido caracterizado por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

tiene la misma estructura química. Por ejemplo, tienen la misma secuencia de bases, el mismo patrón de enlaces del esqueleto (es decir, patrón de tipos de enlaces internucleotídicos, por ejemplo, fosfato, fosforotioato, etc.), el mismo patrón de centros quirales del esqueleto (es decir, patrón de estereoquímica del fósforo del enlace ( $R_p/S_p$ )) y el mismo patrón de modificaciones de fósforo del esqueleto (por ejemplo, patrón de grupos "-XLR<sup>1</sup>" en la fórmula I).

### **Especies de oligonucleótidos**

En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, un oligonucleótido comprende la secuencia de, o parte de la secuencia de mipomersen. Mipomersen se basa en la siguiente secuencia de bases GCCT/UCAGT/UCT/UGCT/UT/UCGCACC (SEQ ID NO: 64). En algunas realizaciones, uno o más de cualquiera del nucleótido o enlaces se pueden modificar según la presente invención. En algunas realizaciones de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención, un oligonucleótido tiene la secuencia de  $\underline{G^*C^*C^*U^*C^*dA-dG-dT-dC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G^*C^*A^*C^*C^*}$  (SEQ ID NO: 65) [d = 2'-desoxi, \* = 2'-O-(2-metoxietilo)] con enlaces fosforotioato 3'→5'. Las secuencias de mipomersen modificadas a modo de ejemplo se describen en toda la solicitud, que incluyen, pero no se limitan a, aquellas en la Tabla 2.

En ciertas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado tiene un número de mipomersen. En ciertos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene un número de mipomersen de configuración  $R_p$ . En ciertos aspectos, un oligonucleótido proporcionado tiene un número de mipomersen de configuración  $S_p$ .

Los oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo que comprenden la secuencia de, o parte de la secuencia de mipomersen, se representan en la Tabla 2, a continuación.



Oligo	Estereoquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
109	(Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	3S-13R-3S	74
110	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	3R-13S-3R	75
111	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R <sup>9</sup>	76
112	(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R <sup>9</sup>	77
113	(Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	18S/R <sup>2</sup>	78
114	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	(RRS) <sub>6</sub> -R	79
115	(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	S-(RRS) <sub>6</sub>	80
116	(Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp) -d[GsCsTsCsAsGsTsCsTsGsCsTsCsGsCsAsCsC]	RS-(RRS) <sub>6</sub> -RR	81



Oligo	Estereoquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
133	( <i>Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp</i> )-d[Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts15mCs1Ts15mCs1Ts15mCs1As15mCs15mC]	5R-9S-5R	87
134	( <i>Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp</i> )-d[Gs15mCs15mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts15mCs1Ts15mCs1Ts15mCs1As15mCs15mC]	5S-9R-5S	88
135	Todo- ( <i>Rp</i> )-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	Todo R	89
136	Todo- ( <i>Sp</i> )-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	Todo S	90
137	( <i>Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp</i> )-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	1S-9R-1S	91
138	( <i>Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp</i> )-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	2S-7R-2S	92
139	( <i>Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp</i> )-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	1R-9S-1R	93
140	( <i>Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp</i> )-d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	2R-7S-2R	94

Oligo	Esterеоquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
141	(Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp)- d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	3S-5R-3S	95
142	(Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp)- d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	3R-5S-3R	96
143	(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)- d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	(SSR) <sub>3</sub> -SS	97
144	(Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp)- d[5mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1G]	(RRS) <sub>3</sub> -RR	98
145	Todo-(Rp)- d[5mCs1Ts15mCs1As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts1Ts15mCs1 Gs15mC]	Todo R	99
146	Todo-(Rp)-d[Gs15mCs1Ts1G]	Todo R	
147	Todo-(Rp)-d[5mCs1As1Gs1T]	Todo R	
148	Todo-(Rp)-d[5mCs2As2Gs2Ts25mCs2Ts2Gs25mCs2Ts2Ts25mCs2G]	Todo R	100
149	Todo-(Rp)-d[5mCs4As4Gs4Ts445mCs4Ts4Gs45mCs4Ts4Ts45mCs4G]	Todo R	101
151	Todo-(Sp)-d[Cs1AsGs1T]	Todo S	
152	Todo-(Sp)-d[Cs1AGs1T]	Todo S	
153	Todo-(Sp)-d[CAs1Gs1T]	Todo S	
157	Todo-(Sp)-d[5mCs1As1Gs1T]	Todo S	









Oligo	Esterеоquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
176	$(Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp)(Gsl5mCs15mCs1Ts15mCs1)_{MOE}[As1Gs1Ts15mCs1Ts1Gs15mCs1Ts15mCs1](Gsl5mCs1As15mCs15mCs1)_{MOE}$	RS-(RRS) <sub>5</sub> -RR	120
177	$(Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp)(Gsl5mCs15mCs1Ts15mCs1)_{MOE}[AGT5mCTG5mCTT5mC](Gsl25mCs2As25mCs25mC)_{MOE}$	RS-(RRS) <sub>5</sub> -RR	121
178	$(Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp)(Gsl5mCs5mCsTs5mCs)_{MOE}[AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs](Gsl5mCsAs5mCs5mC)_7(F: 2-fluorodeoxyribose)$	S-(RRS) <sub>6</sub>	122
179	$(Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp)(Rp)[Gsl8Cs8Cs8Tl8Cs8As8Gs8Tl8Cs8Tl8Cs88Tl88Gs8Cs8Tl88Tl88Cs8Cs8Cs8As8Cs8C]$	RS-(RRS) <sub>5</sub> -RR	123
180	$(Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp)(Rp)[Gsl9Cs9Ts9Cs9As9Gs9Ts9Gs9Ts9Gs9Ts9Ts9Gs9Cs9Gs9Cs9Cs9As9Cs9C]$	RS-(RRS) <sub>5</sub> -RR	124
181	$(Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp)(Rp)[Gsl10Cs10Cs10Ts10Cs10As10Gs10Ts10Cs10Ts10Gs10Cs10Ts10Ts10Cs10Cs10Cs10Gs10Cs10As10Cs10C]$	RS-(RRS) <sub>5</sub> -RR	125

Oligo	Estereoquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
182	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) d[Gs]1Cs11Cs11Ts11Cs11As11Gs11Ts11Cs11Ts11Gs11Cs11Ts11Ts11Cs11C]	RS-(RFS) <sub>5</sub> -RR	126
183	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) d[Gs]12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Cs12Ts12Cs12C]	RS-(RFS) <sub>5</sub> -RR	127
184	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) d[Gs]13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts13Cs13Cs13C]	RS-(RFS) <sub>5</sub> -RR	128
185	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) d[Gs]14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts14Cs14Cs14C]	RS-(RFS) <sub>5</sub> -RR	129
186	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) d[Gs]15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts15Cs15Cs15C]	RS-(RFS) <sub>5</sub> -RR	130
187	(Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp) d[GsCs1TsCsAs]GsU2CsUsGsd[C5Ts3TsCsGs]CsAs4CsC	RS-(RFS) <sub>5</sub> -RR	131



Oligo	Estereoquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
194	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs12Cs12Cs12Ts12Cs12As12Gs12Ts12Cs12Ts12Gs12Cs12Ts12Ts 12Cs12Gs12Cs1ACs12C]	5S-9R-4S	138
195	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs13Cs13Cs13Ts13Cs13As13Gs13Ts13Cs13Ts13Gs13Cs13Ts13Ts 13Cs13Gs13Cs1ACs13C]	5S-9R-4S	139
196	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs14Cs14Cs14Ts14Cs14As14Gs14Ts14Cs14Ts14Gs14Cs14Ts14Ts 14Cs14Gs14Cs1ACs14C]	5S-9R-4S	140
197	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- d[Gs15Cs15Cs15Ts15Cs15As15Gs15Ts15Cs15Ts15Gs15Cs15Ts15Ts 15Cs15Gs15Cs1ACs15C]	5S-9R-4S	141
198	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- GsCsUsCsAsGsUsCsUsGsCsUsUsCsGsCsACsC	5S-9R-4S	142
199	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs1Cs1Us1Cs1As1Gs1Us1Cs1Us1Gs1Cs1Us1Cs1Us1Cs1Gs1CsACs 1C	5S-9R-4S	143

Oligo	Estereoquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
200	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )- Gs8C88Us8C8s8As8Gs8U8s8C8s8U8s8Gs8C8s8U8s8C8s8Gs8C8s1AC s8C	5S-9R-4S	144
201	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )- Gs9C9Cs9Us9Cs9As9Gs9Us9Cs9Us9Gs9Cs9Us9Cs9Gs9Cs1AC s9C	5S-9R-4S	145
202	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )- Gs10Cs10Cs10Us10Cs10As10Gs10Us10Cs10Us10Cs10Us10Cs10Cs10Us10Us 10Cs10Gs10Cs1ACs10C	5S-9R-4S	146
203	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )- Gs11Cs11Cs11Us11Cs11As11Gs11Us11Cs11Us11Cs11Cs11Us11Us 11Cs11Gs11Cs1ACs11C	5S-9R-4S	147
204	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )- Gs12Cs12Cs12Us12Cs12As12Gs12Us12Cs12Us12Cs12Us12Cs12Us12Us 12Cs12Gs12Cs1ACs12C	5S-9R-4S	148



Oligo	Estereoquímica/Secuencia	Descripción	SEQ ID NO:
205	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs13Cs13Cs13Us13Cs13Gs13Us13Cs13Us13Gs13Cs13Us13Us 13Cs13Gs13Cs14Cs13C	5S-9R-4S	149
206	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs14Cs14Cs14Us14Cs14As14Cs14Us14Cs14Us14Cs14Cs14Us 14Cs14Gs14Cs14Cs14C	5S-9R-4S	150
207	(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)- Gs15Cs15Cs15Us15Cs15As15Gs15Us15Cs15Us15Gs15Cs15Us15Us 15Cs15Gs15Cs14Cs15C	5S-9R-4S	151

**Composiciones de oligonucleótidos**

La presente invención proporciona composiciones que comprenden o que consiste en una pluralidad de oligonucleótidos proporcionados (por ejemplo, composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados). En algunas realizaciones, todos esos oligonucleótidos proporcionados son del mismo tipo, es decir, todos tienen la misma secuencia de bases, patrón de enlaces del esqueleto (es decir, patrón de tipos de enlaces internucleotídicos, por ejemplo, fosfato, fosforotioato, etc.), patrón de centros quirales del esqueleto (es decir, patrón de estereoquímica del fósforo del enlace ( $R_p/S_p$ )) y patrón de modificaciones del fósforo del esqueleto (por ejemplo, patrón de grupos "-XLR<sup>1</sup>" en la fórmula I). En muchas realizaciones, sin embargo, las composiciones proporcionadas comprenden una pluralidad de tipos de oligonucleótidos, normalmente en cantidades relativas predeterminadas.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada es una composición de mipomersen quiralmente pura. Es decir, en algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada proporciona mipomersen como único diaestereómero con respecto a la configuración del fósforo del enlace.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada es una composición de mipomersen quiralmente uniforme. Es decir, en algunas realizaciones, cada fósforo del enlace de mipomersen está en la configuración  $R_p$  o cada fósforo del enlace de mipomersen está en la configuración  $S_p$ .

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de uno o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. Un experto en las técnicas químicas y medicinales reconocerá que la selección y la cantidad de cada uno del uno o más tipos de oligonucleótidos proporcionados en una composición proporcionada dependerá del uso previsto de esa composición. Es decir, un experto en las técnicas relevantes diseñaría una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada de forma que las cantidades y los tipos de oligonucleótidos proporcionados contenidos en ella hicieran que la composición en conjunto tuviera ciertas características deseables (por ejemplo, biológicamente deseable, terapéuticamente deseable, etc.).

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de dos o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de tres o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de cuatro o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de cinco o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de seis o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de siete o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de ocho o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de nueve o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de diez o más tipos de oligonucleótidos proporcionados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende una combinación de quince o más tipos de oligonucleótidos proporcionados.

Una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada puede ser una combinación de una cantidad de mipomersen quiralmente uniforme de la configuración  $R_p$  y una cantidad de mipomersen quiralmente uniforme de la configuración  $S_p$ .

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada es una combinación de una cantidad de mipomersen quiralmente uniforme de la configuración  $R_p$ , una cantidad de mipomersen quiralmente uniforme de la configuración  $S_p$ , y una cantidad de uno o más mipomersen quiralmente puros de una forma diaestereomérica deseada.

En algunas realizaciones, un tipo de oligonucleótido proporcionado se selecciona de los descritos en el documento de patente PCT/US2013/050407. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido seleccionado de los descritos en el documento de patente PCT/US2013/050407.

**Métodos de preparación de oligonucleótidos quiralmente controlados y composiciones de los mismos**

En el presente documento se desvelan métodos de preparación de oligonucleótidos quiralmente controlados y composiciones quiralmente controladas según la invención que comprende uno o más tipos de nucleótidos específicos. Como se observa anteriormente, la expresión "tipo de oligonucleótido", como se usa en el presente documento, define

un oligonucleótido que tiene una secuencia de bases particular, patrón de enlaces del esqueleto, patrón de centros quirales del esqueleto y patrón de modificaciones de fósforo del esqueleto (por ejemplo, grupos "-XLR<sup>1</sup>"). Los oligonucleótidos de un "tipo" designado común son estructuralmente idénticos entre sí con respecto a la secuencia de bases, patrón de enlaces del esqueleto, patrón de centros quirales del esqueleto y patrón de modificaciones de fósforo del esqueleto.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado proporcionado en la invención tiene propiedades diferentes de las de la mezcla de oligonucleótidos estereoaleatorios correspondiente. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado tiene lipofilia diferente de la de la mezcla de oligonucleótidos estereoaleatorios.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado tiene un tiempo de retención diferente en HPLC. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado puede tener un tiempo de retención pico significativamente diferentes del de la mezcla de oligonucleótidos estereoaleatorios correspondiente. Durante la purificación de oligonucleótidos usando HPLC como se pone en práctica, en general, en la técnica, se perderán en gran medida ciertos oligonucleótidos quiralmente controlados, sino por completo. Durante la purificación de oligonucleótidos usando HPLC como se pone en práctica, en general, en la técnica, se perderán en gran medida ciertos oligonucleótidos quiralmente controlados, sino por completo. Una de las consecuencias es que ciertos diaestereómeros de una mezcla de oligonucleótidos estereoaleatorios (ciertos oligonucleótidos quiralmente controlados) no se prueban en los ensayos. Otra consecuencia es que de lotes a lotes, debido a los inevitables errores instrumentales y humanos, el oligonucleótido estereoaleatorio supuestamente "puro" tendrá composiciones incoherentes en las que los diaestereómeros en la composición, y sus cantidades relativas y absolutas, son diferentes de lotes a lotes. El oligonucleótido quiralmente controlado y la composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada en la presente invención vence dichos problemas, ya que un oligonucleótido quiralmente controlado se sintetiza en un modo quiralmente controlado como un único diaestereómero, y una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende niveles predeterminados de uno o más tipos de oligonucleótidos individuales.

Un experto en las técnicas químicas y sintéticas apreciará que los métodos de síntesis desvelados en el presente documento proporcionan un grado de control durante cada etapa de la síntesis de un oligonucleótido proporcionado de forma que cada unidad de nucleótido del oligonucleótido se pueda diseñar y/o seleccionar por adelantado para tener una esteoquímica particular en el fósforo del enlace y/o una modificación particular en el fósforo del enlace, y/o una base particular, y/o un azúcar particular. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado se diseña y/o selecciona por adelantado para tener una combinación particular de estereocentros en el fósforo del enlace del enlace internucleotídico.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado preparado usando los métodos desvelados en el presente documento se diseña y/o determina para tener una combinación particular de modificaciones del fósforo del enlace. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado preparado usando los métodos desvelados en el presente documento se diseña y/o determina para tener una combinación particular de bases. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado preparado usando los métodos desvelados en el presente documento se diseña y/o determina para tener una combinación particular de azúcares. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado preparado usando los métodos desvelados en el presente documento se diseña y/o determina para tener una combinación particular de una o más de las características estructurales anteriores.

Los métodos desvelados en el presente documento presentan un alto grado de control quiral. Por ejemplo, los métodos desvelados en el presente documento facilitan el control de la configuración estereoquímica de cada único fósforo del enlace dentro de un oligonucleótido proporcionado. En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan un oligonucleótido que comprende uno o más enlaces internucleotídicos modificados que tienen independientemente la estructura de la fórmula I.

En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan un oligonucleótido que es un unímero de mipomersen. En algunos aspectos, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan un oligonucleótido que es un unímero de mipomersen de la configuración Rp. En algunos aspectos, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan un oligonucleótido que es un unímero de mipomersen de configuración Sp.

En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, es decir, una composición de oligonucleótidos que contiene niveles predeterminados de tipos de oligonucleótidos individuales. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende más de un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados comprende una pluralidad de tipos de oligonucleótidos. Las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados a modo de ejemplo preparadas según la presente divulgación se describen en el presente documento.

En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan composiciones de mipomersen quiralmente puras con respecto a la configuración del fósforo del enlace. Es decir, los métodos

desvelados en el presente documento pueden proporcionar composiciones de mipomersen en donde mipomersen existe en la composición en forma de un único diaestereómero con respecto a la configuración del fósforo del enlace.

5 En algunas realizaciones, los métodos desvelados en el presente documento proporcionan composiciones de mipomersen quiralmemente uniformes con respecto a la configuración del fósforo del enlace. Es decir, los métodos desvelados en el presente documento pueden proporcionar composiciones de mipomersen en las que todas las unidades de nucleótidos el presente documento tiene la misma estereoquímica con respecto a la configuración del fósforo del enlace, por ejemplo, todas las unidades de nucleótidos son de la configuración Rp en el fósforo del enlace o todas las unidades de nucleótidos son de la configuración Sp en el fósforo del enlace.

10 En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior al 50 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 55 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 60 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 65 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 70 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 75 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 80 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 85 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 90 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 91 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 92 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 93 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 94 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 95 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 96 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 97 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 98 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 99 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 99,5 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 99,6 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 99,7 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 99,8 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a aproximadamente el 99,9 %. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmemente controlado proporcionado tiene una pureza superior a al menos aproximadamente el 99 %.

40 Según la invención, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados es una composición diseñada para comprender un único tipo de oligonucleótido. En ciertas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 50 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 50 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 50 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 55 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 60 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 65 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 70 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 75 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 80 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 85 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 90 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 91 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 92 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 93 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 94 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 95 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 96 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 97 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 98 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 99 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 99,5 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 99,6 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 99,7 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 99,8 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica del 99,9 %. En algunas realizaciones, dichas composiciones tienen una pureza diaestereomérica de al menos el 99 %.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados es una composición diseñada para comprender múltiples tipos de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención permiten la generación de una biblioteca de oligonucleótidos quiralmente controlados de forma que una cantidad preseleccionada de uno cualquiera o más tipos de oligonucleótidos quiralmente controlados se pueda mezclar con uno cualquiera o varios de otros tipos de oligonucleótidos quiralmente controlados para crear una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados. En algunas realizaciones, la cantidad preseleccionada de un tipo de oligonucleótido es una composición que tiene una cualquiera de las purezas diaestereoméricas anteriormente descritas.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de preparación de un oligonucleótido quiralmente controlado que comprende etapas de:

(1) acoplamiento;

(2) terminación;

(3) modificación;

(4) desbloqueo; y

(5) repetir las etapas (1) - (4) hasta que se logre una longitud deseada.

Cuando se describen los métodos proporcionados, la palabra "ciclo" tiene su significado habitual como es entendido por un experto habitual en la técnica. En algunas realizaciones, una ronda de etapas (1)-(4) se denomina un ciclo.

En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de preparación de composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados, que comprenden las etapas de:

(a) proporcionar una cantidad de un primer oligonucleótido quiralmente controlado; y

(b) opcionalmente proporcionar una cantidad de uno o más oligonucleótidos quiralmente controlados adicionales.

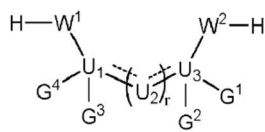
En algunas realizaciones, un primer oligonucleótido quiralmente controlado es un tipo de oligonucleótido, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, uno o más oligonucleótidos quiralmente controlados adicionales tiene uno o más tipos de oligonucleótido, como se describe en el presente documento.

Un experto en las técnicas químicas y sintéticas relevantes reconocerá el grado de versatilidad y control de la variación estructural y la configuración estereoquímica de un oligonucleótido proporcionado cuando se sintetiza usando los métodos de la presente invención. Por ejemplo, después de completarse un primer ciclo, se puede realizar un ciclo posterior usando una unidad de nucleótido individualmente seleccionada para el ciclo posterior que, en algunas realizaciones, comprende una nucleobase y/o un azúcar que es diferente de la nucleobase y/o el azúcar del primer ciclo. Asimismo, el auxiliar quiral usado en la etapa de acoplamiento del ciclo posterior puede ser diferente del auxiliar quiral usado en el primer ciclo, de forma que el segundo ciclo genere un enlace de fósforo de una configuración estereoquímica diferente. En algunas realizaciones, la estereoquímica del fósforo del enlace en el enlace internucleotídico recién formado se controla usando fosforamiditos estereoquímicamente puros. Además, el reactivo de modificación usado en la etapa de modificación de un ciclo posterior puede ser diferente del reactivo de modificación usado en el primer ciclo o anterior. El efecto acumulado de este enfoque de ensamblaje iterativo es tal que cada componente de un oligonucleótido proporcionado puede ser estructuralmente y configuracionalmente confeccionado a un alto grado. Una ventaja adicional de este enfoque es que la etapa de terminación minimiza la formación de "n-1" impurezas que harían, de otro modo, que el aislamiento de un oligonucleótido proporcionado fuera extremadamente difícil, y especialmente los oligonucleótidos de mayores longitudes.

En algunas realizaciones, un ciclo a modo de ejemplo del método de preparación de oligonucleótidos quiralmente controlados se ilustra en el Esquema I. En el Esquema I,



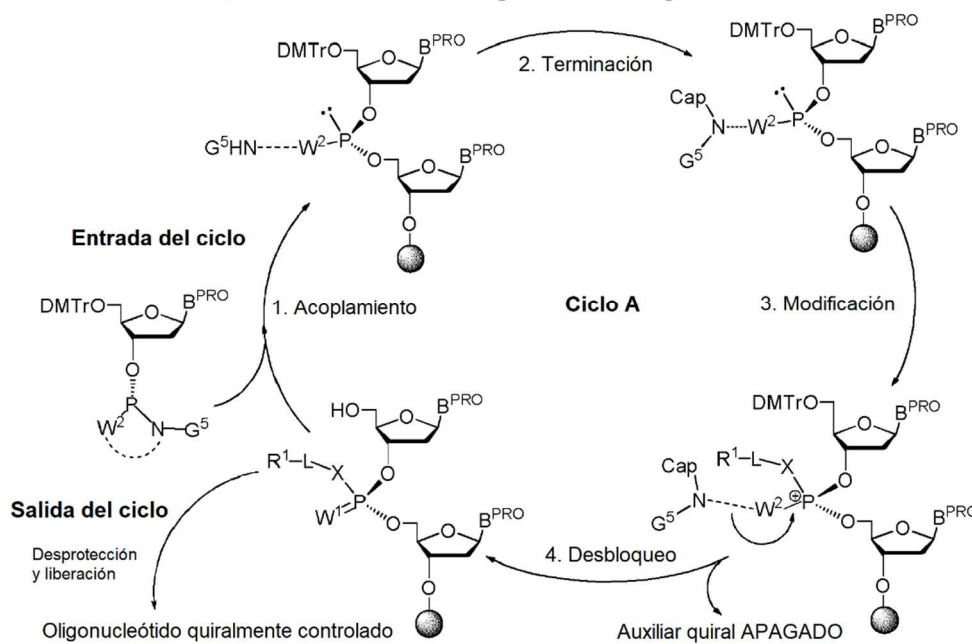
representa el soporte sólido, y opcionalmente una porción del oligonucleótido quiralmente controlado en crecimiento unido al soporte sólido. El auxiliar quiral ejemplificado tiene la estructura de la fórmula 3-1:



Fórmula 3-I

que se describe más a continuación. "Tapa" es cualquier resto químico introducido en el átomo de nitrógeno por la etapa de terminación, y en algunas realizaciones, es un grupo protector de amino. Un experto habitual en la técnica entiende que en el primer ciclo puede haber solo un nucleósido unido al soporte sólido cuando empieza, y la salida del ciclo se puede realizar opcionalmente antes del desbloqueo. Como entiende un experto en la técnica, B<sup>PRO</sup> es una base protegida usada en la síntesis de oligonucleótidos. Cada etapa del ciclo anteriormente representado del Esquema I se describe a continuación.

[00549] Esquema I. Síntesis de oligonucleótido quiralmente controlado



**Síntesis en soporte sólido**

En algunas realizaciones, la síntesis de un oligonucleótido proporcionado se realiza en fase sólida. En algunas realizaciones, los grupos reactivos presentes en un soporte sólido están protegidos. En algunas realizaciones, los grupos reactivos presentes en un soporte sólido están sin proteger. Durante la síntesis de oligonucleótidos, un soporte sólido se trata con diversos reactivos en varios ciclos de síntesis para lograr la elongación escalonada de una cadena de oligonucleótidos en crecimiento con unidades de nucleótidos individuales. La unidad de nucleósidos en el extremo de la cadena que se une directamente al soporte sólido se llama "el primer nucleósido", como se usa en el presente documento. Un primer nucleósido se une a un soporte sólido por un resto conector, es decir, un dirradical con enlaces covalentes entre cualquiera de los CPG, un polímero u otro soporte sólido y un nucleósido. El conector permanece intacto durante los ciclos de síntesis realizados para ensamblar la cadena de oligonucleótido y se escinde después del ensamblaje de la cadena para liberar el oligonucleótido del soporte.

Los soportes sólidos para la síntesis de ácidos nucleicos en fase sólida incluyen los soportes descritos en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 4.659.774, 5.141.813, 4.458.066; las patentes de EE. UU. de Caruthers N.º 4.415.732, 4.458.066, 4.500.707, 4.668.777, 4.973.679 y 5.132.418; las patentes de EE. UU. de Andrus et al. N.º 5.047.524, 5.262.530; y la patente de EE. UU. de Koster N.º 4.725.677 (reexpedida como Re34.069). En algunas realizaciones, una fase sólida es un soporte de polímero orgánico. En algunas realizaciones, una fase sólida es un soporte de polímero inorgánico. En algunas realizaciones, un soporte de polímero orgánico es poliestireno, aminometilpoliestireno, un copolímero de injerto de polietilenglicol-poliestireno, poli(acrilamida, polimetacrilato, poli(alcohol vinílico), polímero altamente reticulado (HCP), u otros polímeros sintéticos, hidratos de carbono tales como celulosa y almidón u otros hidratos de carbono poliméricos, u otros polímeros orgánicos y cualquier copolímero, material compuesto o combinación de los materiales inorgánicos u orgánicos anteriores. En algunas realizaciones, un soporte de polímero inorgánico es sílice, alúmina, polividrio controlado (CPG), que es un soporte de gel de sílice, o aminopropil CPG. Otros soportes sólidos útiles incluyen soportes sólidos de flúor (véase, *por ejemplo*, el documento de patente

WO/2005/070859), soportes sólidos de alquilamina de cadena larga (LCAA)-vidrio de poro controlado (CPG) (véanse, por ejemplo, S. P. Adams, K. S. Kavka, E. J. Wykes, S. B. Holder y G. R. Galluppi, J. Am. Chem. Soc., 1983, 105, 661-663; G. R. Gough, M. J. Bruden y P. T. Gilham, Tetrahedron Lett., 1981, 22, 4177-4180). Los soportes de membrana y las membranas poliméricas (véase, por ejemplo, Innovation and Perspectives in Solid Phase Synthesis, Peptides, Proteins and Nucleic Acids, ch 21 pp 157-162, 1994, Ed. Roger Epton y la patente de EE. UU. N.º 4.923.901) también son útiles para la síntesis de ácidos nucleicos. Una vez formada, una membrana puede ser químicamente funcionalizada para su uso en la síntesis de ácidos nucleicos. Además de la unión de un grupo funcional a la membrana, el uso de un grupo conector o espaciador unido a la membrana también se usa en algunas realizaciones para minimizar el impedimento estérico entre la membrana y la cadena sintetizada.

Otros soportes sólidos adecuados incluyen, en general, los conocidos en la técnica por ser adecuados para su uso en las metodologías de fase sólida, que incluyen, por ejemplo, vidrio comercializado como el soporte Primer™ 200, vidrio de poro controlado (CPG), vidrio de poro controlado con oxalilo (véase, por ejemplo, Alul, et al., Nucleic Acids Research, 1991, 19, 1527), TentaGel Support - un soporte derivatizado con aminopolietilenglicol (véase, por ejemplo, Wright, et al., Tetrahedron Lett., 1993, 34, 3373) y Poros - un copolímero de poliestireno/divinilbenceno.

Se ha mostrado el uso de polímeros activados en la superficie en la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas naturales y modificados en varios medios de soporte sólido. Un material de soporte sólido puede ser cualquier polímero de porosidad adecuadamente uniforme, que tiene contenido de amina suficiente, y flexibilidad suficiente para ser sometido a cualquier manipulación relacionada sin perder la integridad. Los ejemplos de materiales seleccionados adecuados incluyen nailon, polipropileno, poliéster, politetrafluoroetileno, poliestireno, policarbonato y nitrocelulosa. Otros materiales pueden servir de soporte sólido, dependiendo del diseño del investigador. En vista de algunos diseños, se puede seleccionar, por ejemplo, un metal recubierto, en particular oro o platino (véase, por ejemplo, la publicación de EE. UU. N.º 20010055761). En una realización de síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, un nucleósido está sin anclar a un soporte sólido que está funcionalizado con restos hidroxilo o amino. Alternativamente, un soporte sólido se derivatiza para proporcionar un grupo trialcóxitrilo lábil al ácido, tal como un grupo trimetoxitrilo (TMT). Sin desear quedar ligado a teoría, se espera que la presencia de un grupo protector trialcóxitrilo permita la destrilación inicial en condiciones comúnmente usadas en los sintetizadores de ADN. Para una liberación más rápida del material de oligonucleótido en disolución con amoníaco acuoso, se introduce opcionalmente un conector de diglicoato sobre el soporte.

En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado se sintetiza alternativamente de la dirección 5' a 3'. En algunas realizaciones, un ácido nucleico se une a un soporte sólido a través de su extremo 5' del ácido nucleico en crecimiento, presentando así su grupo 3' para la reacción, es decir, usando fosforamiditos de 5'-nucleósido o en reacción enzimática (por ejemplo, ligación y polimerización usando 5'-trifosfatos de nucleósido). Cuando se considera la síntesis de 5' a 3', las etapas iterativas de la presente invención permanecen inalteradas (es decir, terminación y modificación en el fósforo quiral).

#### **Resto de enlace**

Se usa opcionalmente un resto de enlace o conector para conectar un soporte sólido con un compuesto que comprende un resto nucleófilo libre. Se conocen conectores adecuados, tales como moléculas cortas que sirven para conectar un soporte sólido con grupos funcionales (por ejemplo, grupos hidroxilo) de moléculas de nucleósidos iniciales en técnicas sintéticas en fase sólida. En algunas realizaciones, el resto de enlace es un conector de ácido succinámico, o un conector de succinato (-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-), o un conector de oxalilo (-CO-CO-). En algunas realizaciones, el resto de enlace y el nucleósido se unen juntos mediante un enlace éster. En algunas realizaciones, un resto de enlace y un nucleósido se unen juntos mediante un enlace amida. En algunas realizaciones, un resto de enlace conecta un nucleósido con otro nucleótido o ácido nucleico. Los conectores adecuados se desvelan en, por ejemplo, Oligonucleotides And Analogues A Practical Approach, Ekstein, F. Ed., IRL Press, N.Y., 1991, Capítulo 1, y Solid-Phase Supports for Oligonucleotide Synthesis, Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28.

Se usa un resto conector para conectar un compuesto que comprende un resto nucleófilo libre con otro nucleósido, nucleótido o ácido nucleico. En algunas realizaciones, un resto de enlace es un enlace fosfodiéster. En algunas realizaciones, un resto de enlace es un resto *H*-fosfonato. En algunas realizaciones, un resto de enlace es un enlace de fósforo modificado como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, se usa un conector universal (UnyLinker) para unir el oligonucleótido con el soporte sólido (Ravikumar et al., Org. Process Res. Dev., 2008, 12 (3), 399-410). En algunas realizaciones, se usan otros conectores universales (Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28). En algunas realizaciones, se usan diversos conectores ortogonales (tales como conectores disulfuro) (Pon, R. T., Curr. Prot. Nucleic Acid Chem., 2000, 3.1.1-3.1.28).

#### **Condiciones generales - disolventes para síntesis**

Las síntesis de oligonucleótidos proporcionados se realizan, en general, en disolventes orgánicos apróticos. En algunas realizaciones, un disolvente es un disolvente de nitrilo, tal como, por ejemplo, acetonitrilo. En algunas realizaciones, un disolvente es un disolvente de amina básica, tal como, por ejemplo, piridina. En algunas realizaciones, un disolvente es un disolvente etéreo, tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano. En algunas realizaciones, un disolvente

es un hidrocarburo halogenado, tal como, por ejemplo, diclorometano. En algunas realizaciones, se usa una mezcla de disolventes. En ciertas realizaciones, un disolvente es una mezcla de una cualquiera o más de las clases anteriormente descritas de disolventes.

5 En algunas realizaciones, cuando un disolvente orgánico aprótico no es básico, está presente una base en la etapa de reacción. En algunas realizaciones donde está presente una base, la base es una base de amina, tal como, por ejemplo, piridina, quinolina, o *N,N*-dimetilanilina. A modo de ejemplo, otras bases de amina incluyen pirrolidina, piperidina, *N*-metilpirrolidina, piridina, quinolina, *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) o *N,N*-dimetilanilina.

10 En algunas realizaciones, una base es distinta de una base de amina.

En algunas realizaciones, un disolvente orgánico aprótico es anhidro. En algunas realizaciones, un disolvente orgánico aprótico anhidro está recién destilado. En algunas realizaciones, un disolvente orgánico aprótico anhidro recién destilado es un disolvente de amina básica, tal como, por ejemplo, piridina. En algunas realizaciones, un disolvente orgánico aprótico anhidro recién destilado es un disolvente etéreo, tal como, por ejemplo, tetrahidrofurano. En algunas realizaciones, un disolvente orgánico aprótico anhidro recién destilado es un disolvente de nitrilo, tal como, por ejemplo, acetonitrilo.

### Activación

20 Un resto de *H*-fosfonato aquiral se trata con el primer reactivo de activación para formar el primer producto intermedio. En una realización, el primer reactivo de activación se añade a la mezcla de reacción durante la etapa de condensación. El uso del primer reactivo de activación depende de las condiciones de reacción, tales como los disolventes que se usan para la reacción. Los ejemplos del primer reactivo de activación son fosgeno, triclorometilcloroformiato, bis(triclorometil)carbonato (BTC), cloruro de oxalilo,  $\text{Ph}_3\text{PCl}_2$ ,  $(\text{PhO})_3\text{PCl}_2$ , cloruro *N,N*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl), hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-il)-2-pirrolidin-1-il-1,3,2-diazafosfolidinio (MNTP) o hexafluorofosfato de 3-nitro-1,2,4-triazol-1-il-tris(pirrolidin-1-il)fosfonio (PyNTP).

30 El ejemplo de resto *H*-fosfonato aquiral es un compuesto mostrado en el esquema anterior. DBU representa 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno.  $\text{H}^+\text{DBU}$  puede ser, por ejemplo, ion amonio, ion alquilamonio, ion iminio heteroaromático o ion iminio heterocíclico, cualquiera de los cuales es primario, secundario, terciario o cuaternario, o un ion metálico monovalente.

### Reacción con reactivo quiral

35 Después de la primera etapa de activación, el resto *H*-fosfonato aquiral activado reacciona con un reactivo quiral, que se representa por la fórmula (Z-I) o (Z-I'), para formar un producto intermedio quiral de la fórmula (Z-Va), (Z-Vb), (Z-Va') o (Z-Vb').

### Etapa de condensación estereoespecífica

40 Un producto intermedio quiral de la fórmula Z-Va ((Z-Vb), (Z-Va') o (Z-Vb')) se trata con el segundo reactivo de activación y un nucleósido para formar un producto intermedio condensado. El nucleósido puede estar sobre el soporte sólido. Los ejemplos del segundo reactivo de activación son 4,5-dicianoimidazol (DCI), 4,5-dicloroimidazol, triflato de 1-fenilimidazol (PhIMT), triflato de bencimidazol (BIT), benzotriazol, 3-nitro-1,2,4-triazol (NT), tetrazol, 5-etiltiotetrazol (ETT), 5-benciltiotetrazol (BTT), 5-(4-nitrofenil)tetrazol, triflato de *N*-cianometilpirrolidinio (CMPT), triflato de *N*-cianometilpiperidinio, triflato de *N*-cianometildimetilamonio. Un producto intermedio quiral de la fórmula Z-Va ((Z-Vb), (Z-Va') o (Z-Vb')) se puede aislar como un monómero. Normalmente, el producto intermedio quiral de Z-Va ((Z-Vb), (Z-Va') o (Z-Vb')) no se aísla y se somete a una reacción en el mismo recipiente con un nucleósido o nucleósido modificado para proporcionar un compuesto de fosfito quiral, un producto intermedio condensado. En otras realizaciones, cuando el método se realiza por síntesis en fase sólida, el soporte sólido que comprende el compuesto se filtra de los productos secundarios, impurezas y/o reactivos.

### Etapa de terminación

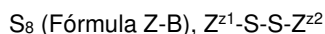
55 Si el ácido nucleico final es mayor que un dímero, el resto -OH sin terminar se termina con un grupo de bloqueo y el auxiliar quiral en el compuesto también puede ser terminado con un grupo de bloqueo para formar un producto intermedio condensado terminado. Si el ácido nucleico final es un dímero, entonces la etapa de terminación no es necesaria.

### Etapa de modificación

60 El compuesto se modifica por reacción con un electrófilo. El producto intermedio condensado terminado se puede realizar en la etapa de modificación. En algunas realizaciones, la etapa de modificación se realiza usando un electrófilo de azufre, un electrófilo de selenio o un agente de boración. Los ejemplos de etapas de modificación son la etapa de oxidación y sulfurización.



En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:

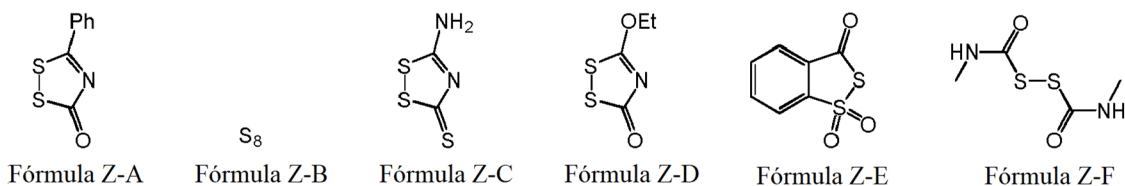


5  
o

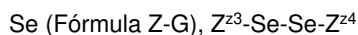


10 en donde  $Z^{z1}$  y  $Z^{z2}$  son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o  $Z^{z1}$  y  $Z^{z2}$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir;  $V^z$  es  $SO_2$ , O o  $NR^f$ ; y  $R^f$  es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

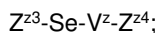
15 En algunas realizaciones del método, el electrófilo de azufre es un compuesto de la siguiente fórmula Z-A, Z-B, Z-C, Z-D, Z-E o Z-F:



20 En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:

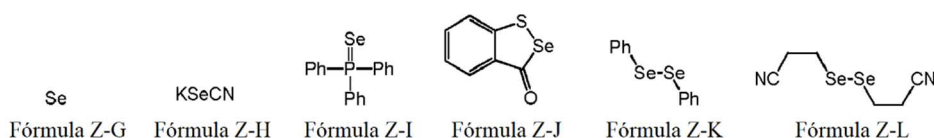


25  
o



30 en donde  $Z^{z3}$  y  $Z^{z4}$  son independientemente alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo, o  $Z^{z3}$  y  $Z^{z4}$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 8 miembros, que puede estar sustituido o sin sustituir;  $V^z$  es  $SO_2$ , S, O o  $NR^f$ ; y  $R^f$  es hidrógeno, alquilo, alquenilo, alquinilo o arilo.

En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto de la fórmula Z-G, Z-H, Z-I, Z-J, Z-K o Z-L.



35 En algunas realizaciones, el agente de boración es borano-*N,N*-diisopropiletilamina ( $BH_3$  DIPEA), borano-piridina ( $BH_3$  Py), borano-2-cloropiridina ( $BH_3$  CPy), borano-anilina ( $BH_3$  An), borano-tetrahidrofurano ( $BH_3$  THF) o borano-dimetilsulfuro ( $BH_3$  Me<sub>2</sub>S).

40 En algunas realizaciones del método, la etapa de modificación es una etapa de oxidación. En algunas realizaciones del método, la etapa de modificación es una etapa de oxidación que usa condiciones similares como se ha descrito anteriormente en la presente solicitud. En algunas realizaciones, una etapa de oxidación es como se desvela en, por ejemplo, los documentos de patente JP 2010-265304 A y WO2010/064146.

45 **Ciclo de elongación de cadena y etapa de desprotección**

50 El producto intermedio condensado terminado se desbloquea para retirar el grupo de bloqueo en el extremo 5' de la cadena de ácido nucleico en crecimiento para proporcionar un compuesto. Se permite opcionalmente que el compuesto vuelva a entrar en el ciclo de elongación de cadena para formar un producto intermedio condensado, un producto intermedio condensado terminado, un producto intermedio condensado terminado modificado y un producto intermedio terminado modificado desprotegido en 5'. Tras al menos una ronda del ciclo de elongación de cadena, el producto intermedio terminado modificado desprotegido en 5' se desbloquea aún más por retirada del ligando auxiliar quiral y otros grupos protectores para, por ejemplo, grupos protectores de nucleobase, nucleobase modificada, azúcar y azúcar modificado, para proporcionar un ácido nucleico. En otras realizaciones, el nucleósido que comprende un

resto 5'-OH es un producto intermedio de un ciclo de elongación de cadena previo como se describe en el presente documento. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método de síntesis de ácidos nucleicos conocido. En realizaciones donde se usa un soporte sólido, el ácido nucleico modificado en el átomo de fósforo se escinde entonces del soporte sólido. En ciertas realizaciones, los ácidos nucleicos siguen unidos sobre el soporte sólido para fines de purificación y luego se escinden del soporte sólido tras la purificación.

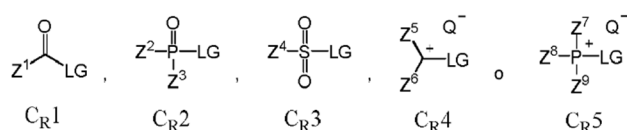
En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método de síntesis de ácidos nucleicos conocido. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método de síntesis de ácidos nucleicos conocido como se describe en la presente solicitud. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método de síntesis de ácidos nucleicos conocido que comprende uno o más ciclos ilustrados en el Esquema I. En aún otras realizaciones, el nucleósido que comprende un resto 5'-OH es un producto intermedio obtenido de otro método de síntesis de ácidos nucleicos conocido que comprende uno o más ciclos ilustrados en el Esquema I-b, I-c o I-d.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de síntesis de oligonucleótidos que usan materiales estables y comercialmente disponibles como materiales de partida. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona métodos de síntesis de oligonucleótidos para producir derivados de oligonucleótidos modificados en el átomo de fósforo estereocontrolados usando un material de partida aquiral.

En algunas realizaciones, el método de la presente invención no provoca degradaciones en las etapas de desprotección. Además, el método no requiere agentes de terminación especiales para producir derivados de oligonucleótidos modificados en el átomo de fósforo.

### Reactivo de condensación

Los reactivos de condensación ( $C_R$ ) útiles según los métodos de la presente invención son de una cualquiera de las siguientes fórmulas generales:



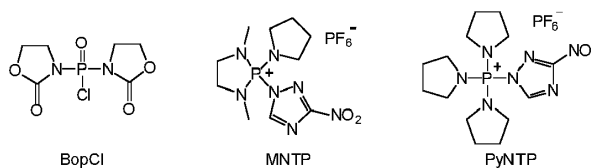
en donde  $Z^1$ ,  $Z^2$ ,  $Z^3$ ,  $Z^4$ ,  $Z^5$ ,  $Z^6$ ,  $Z^7$ ,  $Z^8$  y  $Z^9$  son independientemente un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alquilo, aminoalquilo, cicloalquilo, heterocíclico, cicloalquilalquilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi o heteroariloxi, o en donde cualquiera de  $Z^2$  y  $Z^3$ ,  $Z^5$  y  $Z^6$ ,  $Z^7$  y  $Z^8$ ,  $Z^8$  y  $Z^9$ ,  $Z^9$  y  $Z^7$ , o  $Z^7$  y  $Z^8$  y  $Z^9$  se toman conjuntamente para formar un anillo alicíclico o heterocíclico de 3 a 20 miembros;  $Q^-$  es un contra-anión; y LG es un grupo saliente.

En algunas realizaciones, un contraión de un reactivo de condensación  $C_R$  es  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{TfO}^-$ ,  $\text{Tf}_2\text{N}^-$ ,  $\text{AsF}_6^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  o  $\text{SbF}_6^-$ , en donde Tf es  $\text{CF}_3\text{SO}_2$ . En algunas realizaciones, un grupo saliente de un reactivo de condensación  $C_R$  es F, Cl, Br, I, 3-nitro-1,2,4-triazol, imidazol, alquiltriazol, tetrazol, pentafluorobenceno o 1-hidroxibenzotriazol.

Los ejemplos de reactivos de condensación usados según los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, cloruro de pentafluorobenzoílo, carbonildiimidazol (CDI), 1-mesitilenesulfonyl-3-nitrotriazol (MSNT), clorhidrato de 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI-HCl), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (PyBOP), cloruro de *N,N*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl), hexafluorofosfato de 2-(1*H*-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) y hexafluorofosfato de *O*-benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (HBTU), DIPCDI; bromuro de *N,N*-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopBr), hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-il)-2-pirrolidin-1-il-1,3,2-diazafosfolidinio (MNTP), hexafluorofosfato de 3-nitro-1,2,4-triazol-1-il-tris(pirrolidin-1-il)fosfonio (PyNTP), hexafluorofosfato de bromotripirrolidinofosfonio (PyBrOP); tetrafluoroborato de *O*-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronio (TBTU); y hexafluorofosfato de tetrametilfluoroformamidinio (TFFH). En ciertas realizaciones, un contraión del reactivo de condensación  $C_R$  es  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{BF}_4^-$ ,  $\text{PF}_6^-$ ,  $\text{TfO}^-$ ,  $\text{Tf}_2\text{N}^-$ ,  $\text{AsF}_6^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$  o  $\text{SbF}_6^-$ , en donde Tf es  $\text{CF}_3\text{SO}_2$ .

En algunas realizaciones, un reactivo de condensación es 1-(2,4,6-triisopropilbencenosulfonyl)-5-(piridin-2-il)tetrazolida, cloruro de pivaloílo, hexafluorofosfato de bromotripirrolidinofosfonio, cloruro *N,N*'-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl) o 2-cloro-5,5-dimetil-2-oxo-1,3,2-dioxafosfinano. En alguna realización, un reactivo de condensación es cloruro *N,N*'-bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfínico (BopCl). En algunas realizaciones, un reactivo de condensación se selecciona de los descritos en el documento de patente WO/2006/066260).

En algunas realizaciones, un reactivo de condensación es hexafluorofosfato de 1,3-dimetil-2-(3-nitro-1,2,4-triazol-1-il)-2-pirrolidin-1-il-1,3,2-diazafosfolidinio (MNTP) o hexafluorofosfato de 3-nitro-1,2,4-triazol-1-il-tris(pirrolidin-1-il)fosfonio (PyNTP):



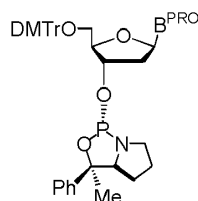
5

### **Selección de base y azúcar del componente de acoplamiento de nucleósidos**

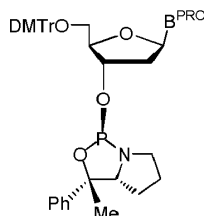
Como se describe en el presente documento, los componentes de acoplamiento de nucleósidos para su uso según los métodos de la presente invención pueden ser los mismos entre sí o pueden ser diferentes entre sí. En algunas realizaciones, los componentes de acoplamiento de nucleósidos para su uso en la síntesis de un oligonucleótido proporcionado son de la misma estructura y/o configuración estereoquímica entre sí. En algunas realizaciones, cada componente de acoplamiento de nucleósidos para su uso en la síntesis de un oligonucleótido proporcionado no es de la misma estructura y/o configuración estereoquímica que ciertos otros componentes de acoplamiento de nucleósidos del oligonucleótido. Las nucleobases y los azúcares a modo de ejemplo para su uso según los métodos de la presente invención se describen en el presente documento. Un experto en las técnicas químicas y sintéticas relevantes reconocerá que cualquier combinación de nucleobases y azúcares descrita en el presente documento se contempla para su uso según los métodos de la presente invención.

### **Etapa de acoplamiento:**

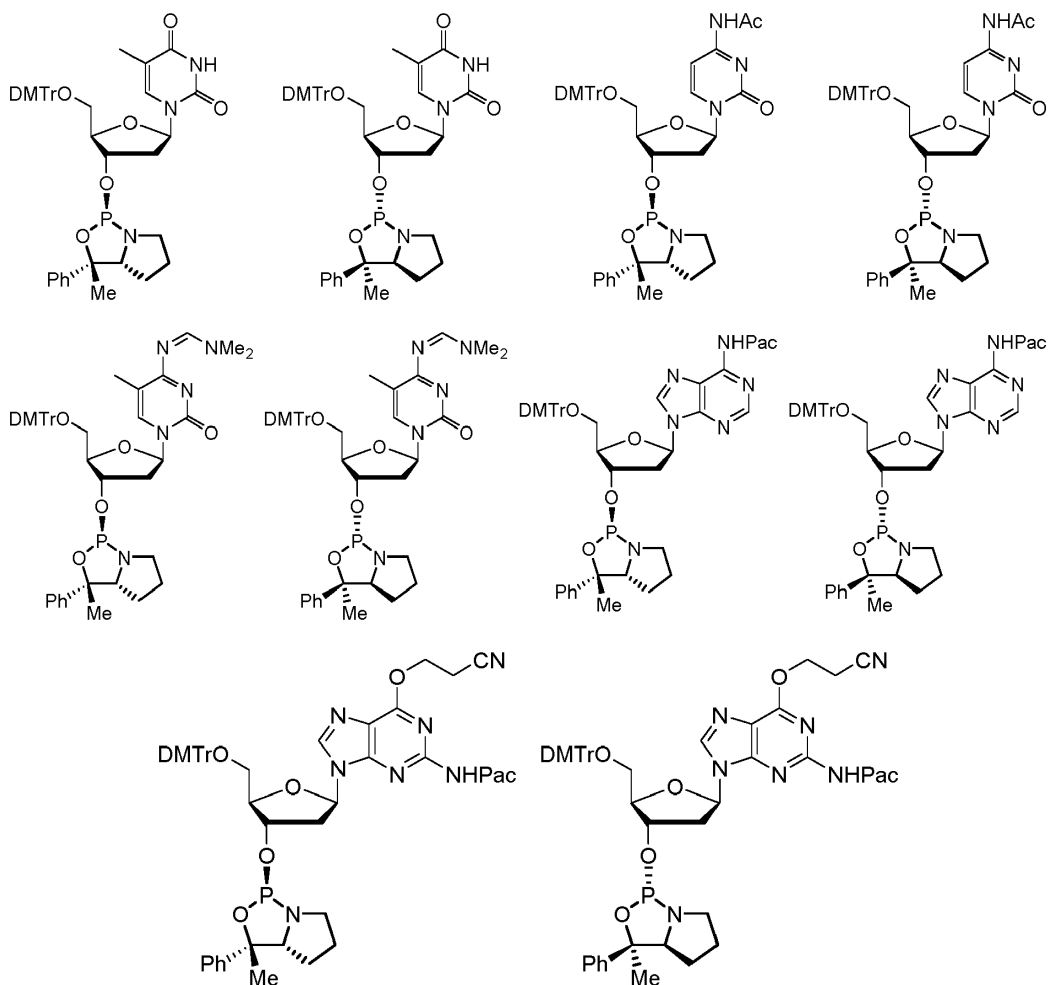
Los procedimientos de acoplamiento y los reactivos quirales y reactivos de condensación a modo de ejemplo para su uso según la presente invención se exponen brevemente en, entre otros, Wada I (documentos de patente JP4348077; WO2005/014609; WO2005/092909), Wada II (documento de patente WO2010/064146) y Wada III (documento de patente WO2012/039448). Los componentes de acoplamiento de nucleósidos quirales para su uso según la presente invención también se denominan en el presente documento "amiditos de Wada". En algunas realizaciones, un componente de acoplamiento tiene la estructura de



30 en donde B<sup>PRO</sup> es una nucleobase protegida. En algunas realizaciones, un componente de acoplamiento tiene la estructura de



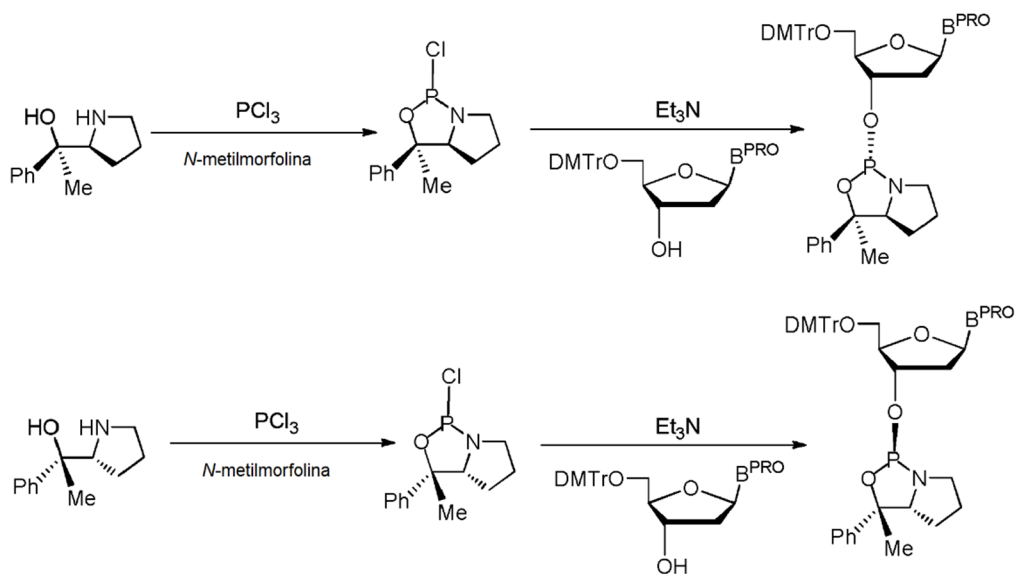
35 en donde B<sup>PRO</sup> es una nucleobase protegida. Los fosforamiditos quirales a modo de ejemplo como componente de acoplamiento se representan a continuación:



5

Uno de los métodos usados para sintetizar el componente de acoplamiento se representa en el Esquema II, a continuación.

**Esquema II.** Síntesis a modo de ejemplo del componente de acoplamiento.



10

En algunas realizaciones, la etapa de acoplamiento comprende hacer reaccionar un grupo hidroxilo libre de una unidad de nucleótido de un oligonucleótido con un componente de acoplamiento de nucleósidos en condiciones adecuadas para efectuar el acoplamiento. En algunas realizaciones, la etapa de acoplamiento va precedida por una etapa de

desbloqueo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el grupo hidroxilo en 5' del oligonucleótido en crecimiento se bloquea (es decir, se protege) y debe ser desbloqueado para reaccionar posteriormente con un componente de acoplamiento de nucleósidos.

5 Una vez se ha desbloqueado el grupo hidroxilo apropiado del oligonucleótido en crecimiento, el soporte se lava y se seca en preparación para el suministro de una disolución que comprende un reactivo quirral y una disolución que comprende un activador. En algunas realizaciones, se suministran simultáneamente un reactivo quirral y un activador. En algunas realizaciones, la coadministración comprende suministrar una cantidad de un reactivo quirral en disolución (por ejemplo, una disolución de fosforamidito) y una cantidad de activador en una disolución (por ejemplo, una disolución de CMPT) en un disolvente aprótico polar, tal como un disolvente de nitrilo (por ejemplo, acetonitrilo).

10 En algunas realizaciones, la etapa de acoplamiento proporciona una composición de producto en bruto en la que el producto de fosfito quirral está presente en un exceso diaestereomérico de > 95 %. En algunas realizaciones, el producto de fosfito quirral está presente en un exceso diaestereomérico de > 96 %. En algunas realizaciones, el producto de fosfito quirral está presente en un exceso diaestereomérico de > 97 %. En algunas realizaciones, el producto de fosfito quirral está presente en un exceso diaestereomérico de > 98 %. En algunas realizaciones, el producto de fosfito quirral está presente en un exceso diaestereomérico de > 99 %.

### **Etapa de terminación:**

20 Los métodos de preparación de oligonucleótidos quirralmente controlados proporcionados comprenden una etapa de terminación. En algunas realizaciones, una etapa de terminación es una etapa única. En algunas realizaciones, una etapa de terminación es dos etapas. En algunas realizaciones, una etapa de terminación es más de dos etapas.

25 En algunas realizaciones, una etapa de terminación comprende las etapas de terminar la amina libre del auxiliar quirral y terminar cualquier grupo hidroxilo en 5' sin reaccionar terminal. En algunas realizaciones, la amina libre del auxiliar quirral y los grupos hidroxilo en 5' sin reaccionar se terminan con el mismo grupo de terminación. En algunas realizaciones, la amina libre del auxiliar quirral y los grupos hidroxilo en 5' sin reaccionar se terminan con diferentes grupos de terminación. En ciertas realizaciones, la terminación con diferentes grupos de terminación permite la retirada selectiva de un grupo de terminación con respecto al otro durante la síntesis del oligonucleótido. En algunas realizaciones, la terminación de ambos grupos ocurre simultáneamente. En algunas realizaciones, la terminación de ambos grupos ocurre iterativamente.

30 En ciertas realizaciones, la terminación ocurre iterativamente y comprende una primera etapa de terminación de la amina libre, seguido por una segunda etapa de terminación del grupo hidroxilo en 5' libre, en donde tanto la amina libre como el grupo hidroxilo en 5' están terminados con el mismo grupo de terminación. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la amina libre del auxiliar quirral se termina usando un anhídrido (por ejemplo, anhídrido fenoxiacético, es decir,  $\text{Pac}_2\text{O}$ ) antes de la terminación del grupo hidroxilo en 5' con el mismo anhídrido. En ciertas realizaciones, la terminación del grupo hidroxilo en 5' con el mismo anhídrido ocurre en condiciones diferentes (por ejemplo, en presencia de uno o más reactivos adicionales). En algunas realizaciones, la terminación del grupo hidroxilo en 5' ocurre en presencia de una base de amina en un disolvente etéreo (por ejemplo, NMI (N-metilimidazol) en THF). La expresión "grupo de terminación" se usa indistintamente en el presente documento con las expresiones "grupo protector" y "grupo de bloqueo".

40 En algunas realizaciones, un grupo de terminación de amina se caracteriza porque termina eficazmente la amina de forma que previene la reordenación y/o la descomposición de las especies de fosfito intermedias. En algunas realizaciones, un grupo de terminación se selecciona para su capacidad para proteger la amina del auxiliar quirral para prevenir la escisión intramolecular del fósforo del enlace internucleotídico.

45 En algunas realizaciones, un grupo de terminación del grupo hidroxilo en 5' se caracteriza porque termina eficazmente el grupo hidroxilo de forma que se prevenga la aparición de "shortmeros", por ejemplo, "n-m" (m y n son números enteros y  $m < n$ ; n es el número de bases en el oligonucleótido selectivo) impurezas que ocurren de la reacción de una cadena de oligonucleótido que deja de reaccionar en un primer ciclo, pero luego reacciona en uno o más ciclos posteriores. La presencia de dichos shortmeros, especialmente "n-1", tiene un efecto perjudicial sobre la pureza del oligonucleótido en bruto y hace que la purificación final del oligonucleótido sea tediosa y, en general, de bajo rendimiento.

50 En algunas realizaciones, se selecciona una tapa particular basándose en su tendencia para facilitar un tipo particular de reacción en condiciones particulares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se selecciona un grupo de terminación por su capacidad para facilitar una reacción de eliminación E1, reacción que escinde la tapa y/o el auxiliar del oligonucleótido en crecimiento. En algunas realizaciones, se selecciona un grupo de terminación para su capacidad para facilitar una reacción de eliminación E2, reacción que escinde la tapa y/o el auxiliar del oligonucleótido en crecimiento. En algunas realizaciones, se selecciona un grupo de terminación para su capacidad para facilitar una reacción de  $\beta$ -eliminación, reacción que escinde la tapa y/o el auxiliar del oligonucleótido en crecimiento.

65

**Etapa de modificación:**

Como se usa en el presente documento, la expresión "etapa modificadora", "etapa de modificación" y "etapa de modificación en P" se usan indistintamente y se refieren, en general, a una cualquiera o más etapas usadas para instalar un enlace internucleotídico modificado. En algunas realizaciones, el enlace internucleotídico modificado tiene la estructura de la fórmula I. Una etapa de modificación en P de la presente invención ocurre durante el ensamblaje de un oligonucleótido proporcionado en vez de después de que se haya completado el ensamblaje de un oligonucleótido proporcionado. Por lo tanto, cada unidad de nucleótido de un oligonucleótido proporcionado puede ser individualmente modificada en el fósforo del enlace durante el ciclo dentro del que está instalada la unidad de nucleótido.

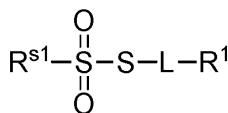
En algunas realizaciones, un reactivo de modificación en P adecuado es un electrófilo de azufre, electrófilo de selenio, electrófilo de oxígeno, reactivo de boración o un reactivo de azida.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, un reactivo de selenio es selenio elemental, una sal de selenio o un diseleniuro sustituido. En algunas realizaciones, un electrófilo de oxígeno es oxígeno elemental, peróxido, o un peróxido sustituido. En algunas realizaciones, un reactivo de boración es un borano-amina (por ejemplo, *N,N*-diisopropiletilamina (BH<sub>3</sub>·DIPEA), borano-piridina (BH<sub>3</sub>·Py), borano-2-cloropiridina (BH<sub>3</sub>·CPy), borano-anilina (BH<sub>3</sub>·An)), un reactivo de borano-éter (por ejemplo, borano-tetrahidrofurano (BH<sub>3</sub>·THF)), un reactivo de borano-dialquilsulfuro (por ejemplo, BH<sub>3</sub>·Me<sub>2</sub>S), anilina-cianoborano o una trifenilfosfina-carboalcoxiborano. En algunas realizaciones, un reactivo de azida comprende un grupo azida capaz de someterse a una reducción posterior para proporcionar un grupo amina.

En algunas realizaciones, un reactivo de modificación de P es un reactivo de sulfurización como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, una etapa de modificación comprende la sulfurización de fósforo para proporcionar un enlace fosforotioato o enlace de tríéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, una etapa de modificación proporciona un oligonucleótido que tiene un enlace internucleotídico de la fórmula I.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona reactivos de sulfurización, y métodos de preparación, y uso de los mismos.

En algunas realizaciones, dichos reactivos de sulfurización son reactivos de tiosulfonato. En algunas realizaciones, un reactivo de tiosulfonato tiene una estructura de la fórmula S-I:



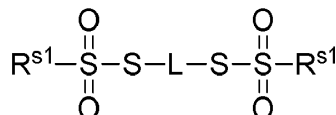
S-I

en donde:

R<sup>S1</sup> es R; y

cada uno de R, L y R<sup>1</sup> es independientemente como se define y describe anteriormente y en el presente documento.

En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización es un reactivo de bis(tiosulfonato). En algunas realizaciones, el reactivo de bis(tiosulfonato) tiene la estructura de la fórmula S-II:



S-II

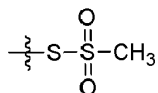
en donde cada uno de R<sup>S1</sup> y L es independientemente como se define y se describe anteriormente y en el presente documento.

Como se define, en general, anteriormente, R<sup>S1</sup> es R, en donde R es como se define y se describe anteriormente y en el presente documento. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es alifático, arilo, heterociclilo o heteroarilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es alquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es alquilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es metilo. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es cianometilo. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es nitrometilo. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es arilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es fenilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>S1</sup> es fenilo. En algunas realizaciones,

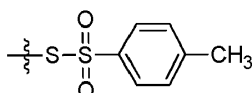
R<sup>s1</sup> es *p*-nitrofenilo. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es *p*-metilfenilo. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es *p*-clorofenilo. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es *o*-clorofenilo. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es 2,4,6-triclorofenilo. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es pentafluorofenilo. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es heterociclilo opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup> es heteroarilo opcionalmente sustituido.

5

En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

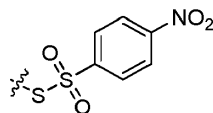


10 (MTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

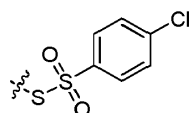


15

(TTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

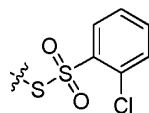


(NO<sub>2</sub>PheTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es



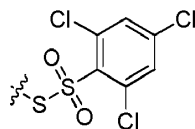
20

(*p*-ClPheTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

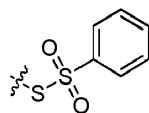


25

ClPheTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

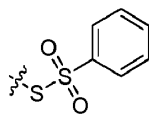


30 (2,4,6-TriClPheTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

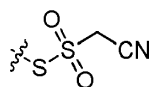


35

(PheTS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es

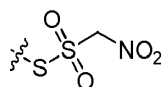


(PFPhETS). En algunas realizaciones, R<sup>s1</sup>-S(O)<sub>2</sub>S- es



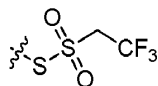
40

(a-CNMTS). En algunas realizaciones,  $R^{s1}\text{-S(O)}_2\text{S-}$  es



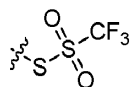
5

(a-NO<sub>2</sub>MTS). En algunas realizaciones,  $R^{s1}\text{-S(O)}_2\text{S-}$  es



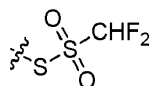
10

(a-CF<sub>3</sub>MTS). En algunas realizaciones,  $R^{s1}\text{-S(O)}_2\text{S-}$  es

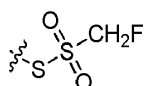


15

(a-CF<sub>3</sub>TS). En algunas realizaciones,  $R^{s1}\text{-S(O)}_2\text{S-}$  es



(a-CHF<sub>2</sub>TS). En algunas realizaciones,  $R^{s1}\text{-S(O)}_2\text{S-}$  es



20

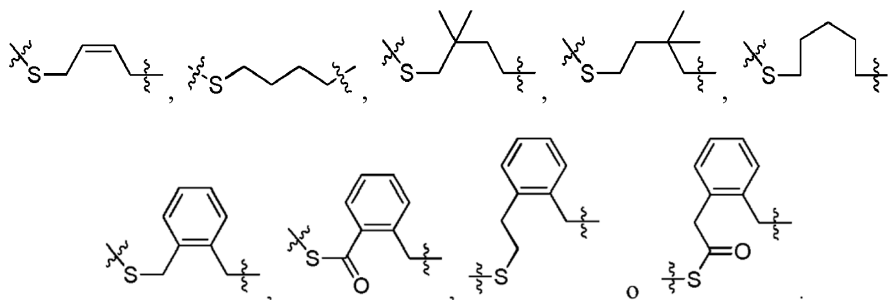
(a-CH<sub>2</sub>FTS).

25 En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde L es  $-\text{S-R}^{\text{L}3}$ - o  $-\text{S-C(O)-R}^{\text{L}3}$ -. En algunas realizaciones, L es  $-\text{S-R}^{\text{L}3}$ - o  $-\text{S-C(O)-R}^{\text{L}3}$ -, en donde R<sup>L3</sup> es un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, L es  $-\text{S-R}^{\text{L}3}$ - o  $-\text{S-C(O)-R}^{\text{L}3}$ -, en donde R<sup>L3</sup> es un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, arileno o heteroarileno opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, En algunas realizaciones, R<sup>L3</sup> es un  $-\text{S-}$ (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-,  $-\text{S-}$ (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-,  $-\text{S-}$ (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-arileno-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-,  $-\text{S-CO-}$ arileno-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)- o  $-\text{S-CO-}$ (alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-arileno-(alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)- opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde L es  $-\text{S-R}^{\text{L}3}$ - o  $-\text{S-C(O)-R}^{\text{L}3}$ -, y el átomo de azufre está conectado a R<sup>1</sup>.

35 En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde L es alquileo, alquileo, arileno o heteroarileno.

En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde L es

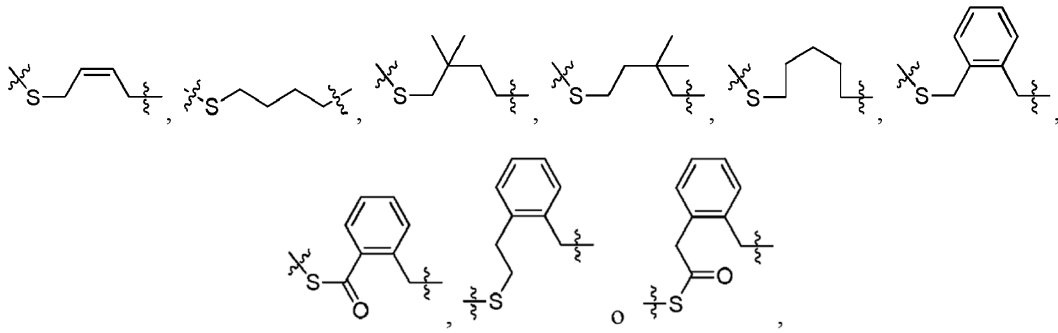
40



45

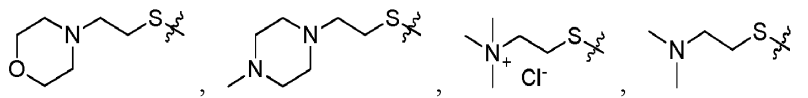
En algunas realizaciones, L es



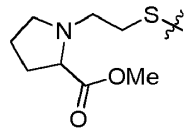


5 en donde el átomo de azufre está conectado a R<sup>1</sup>.

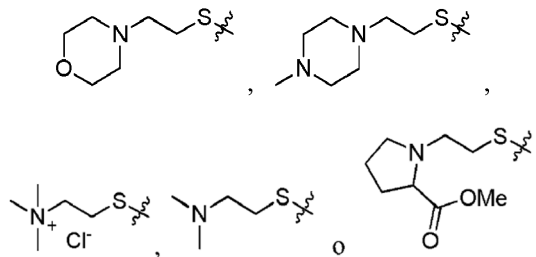
En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde R<sup>1</sup> es



10 o

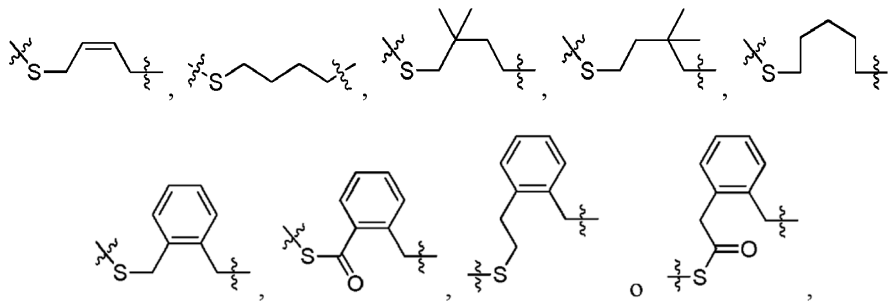


15 En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es

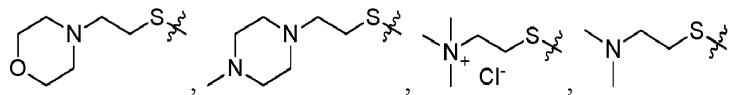


20 en donde el átomo de azufre está conectado a L.

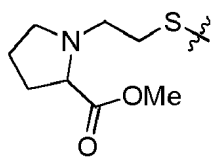
En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde L es



30 en donde el átomo de azufre está conectado a R<sup>1</sup>; y R<sup>1</sup> es



o

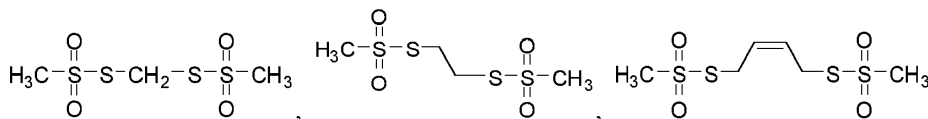


en donde el átomo de azufre está conectado a L.

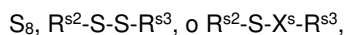
5 En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización tiene la estructura de **S-I** o **S-II**, en donde  $R^1$  es  $-S-R^{L2}$ , en donde  $R^{L2}$  es como se define y se describe anteriormente y en el presente documento. En algunas realizaciones,  $R^{L2}$  es un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de  $-S$ -(alquilen  $C_1-C_6$ )-heterociclilo,  $-S$ -(alquenilen  $C_1-C_6$ )-heterociclilo,  $-S$ -(alquilen  $C_1-C_6$ )- $N(R')_2$ ,  $-S$ -(alquilen  $C_1-C_6$ )- $N(R')_3$ , en donde cada  $R'$  es como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

10 En algunas realizaciones,  $-L-R^1$  es  $-R^{L3}-S-S-R^{L2}$ , en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones,  $-L-R^1$  es  $-R^{L3}-C(O)-S-S-R^{L2}$ , en donde cada variable es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento.

15 Los reactivos de bis(tiosulfonato) a modo de ejemplo de la fórmula **S-II** se representan a continuación:



20 En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:



en donde:

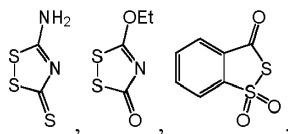
25 cada uno de  $R^{s2}$  y  $R^{s3}$  es independientemente un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático, aminoalquilo, carbociclilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo; o

30  $R^{s2}$  y  $R^{s3}$  se toman conjuntamente con los átomos a los que están unidos para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

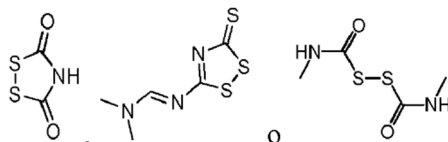
$X^s$  es  $-S(O)_2-$ ,  $-O-$  o  $-N(R')$ ; y

35  $R'$  es como se define y se describe anteriormente y en el presente documento.

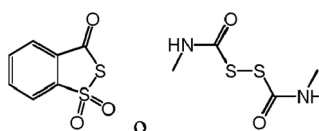
En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización es  $S_8$ ,



40

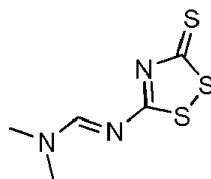


En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización es  $S_8$ ,



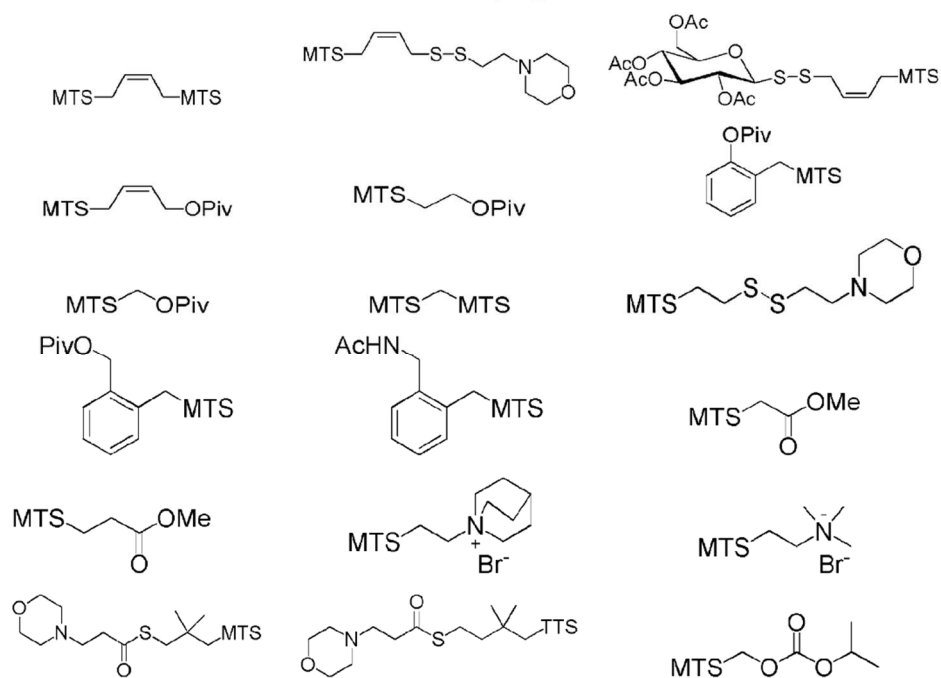
45

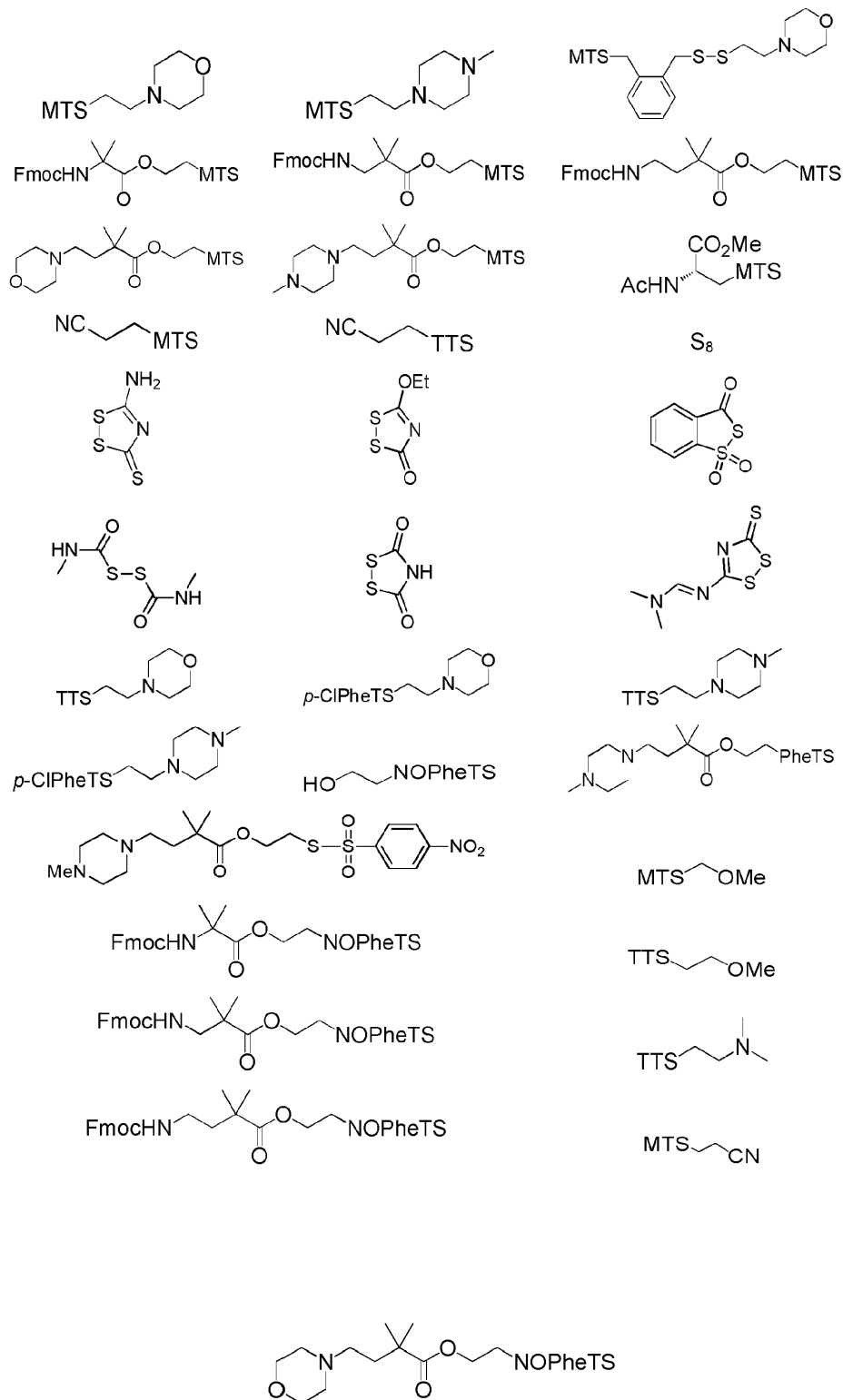
En algunas realizaciones, el reactivo de sulfurización es



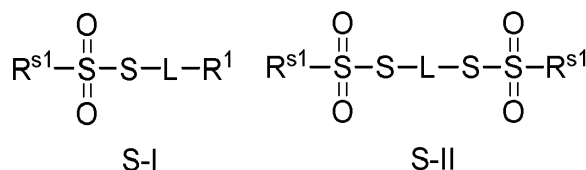
5 Los reactivos de sulfurización a modo de ejemplo se representan en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Reactivos de sulfurización a modo de ejemplo.





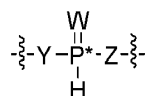
- 5 En algunas realizaciones, un reactivo de sulfurización proporcionado se usa para modificar un H-fosfonato. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se sintetiza un oligonucleótido de H-fosfonato usando, por ejemplo, un método de Wada I o Wada II, y se modifica usando un reactivo de sulfurización de la fórmula **S-I** o **S-II**:



en donde cada uno de R<sup>s1</sup>, L y R<sup>1</sup> son como se describen y se definen anteriormente y en el presente documento.

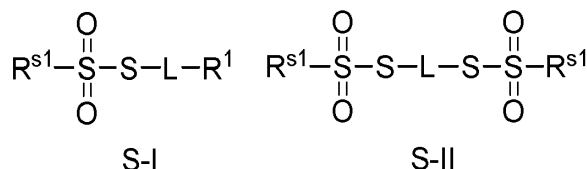
5 En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un proceso de síntesis de un triéster de fosforotioato, que comprende las etapas de:

i) hacer reaccionar un H-fosfonato de la estructura:



10 en donde cada uno de W, Y y Z son como se describen y se definen anteriormente y en el presente documento, con un reactivo de sililación para proporcionar un sililoxifosfonato; y

15 ii) hacer reaccionar el sililoxifosfonato con un reactivo de sulfurización de la estructura **S-I** o **S-II**:

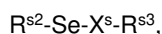


20 para proporcionar un fosforotiotriéster.

En algunas realizaciones, se usa un electrófilo de selenio en lugar de un reactivo de sulfurización para introducir la modificación al enlace internucleotídico. En algunas realizaciones, un electrófilo de selenio es un compuesto que tiene una de las siguientes fórmulas:



o



en donde:

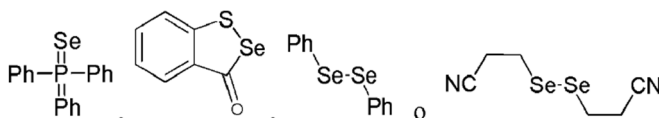
35 cada uno de R<sup>s2</sup> y R<sup>s3</sup> es independientemente un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático, aminoalquilo, carbociclilo, heterociclilo, heterocicloalquilo, arilo, heteroarilo, alquiloxi, ariloxi, heteroariloxi, acilo, amida, imida o tiocarbonilo; o

R<sup>s2</sup> y R<sup>s3</sup> se toman conjuntamente con los átomos a los que están unidos para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

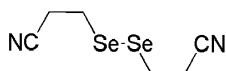
40 X<sup>s</sup> es -S(O)<sub>2</sub>-, -O- o -N(R')-; y

R' es como se define y se describe anteriormente y en el presente documento.

En otras realizaciones, el electrófilo de selenio es un compuesto de Se, KSeCN,



En algunas realizaciones, el electrófilo de selenio es Se o



5 En algunas realizaciones, un reactivo de sulfurización para su uso según la presente invención se caracteriza porque el resto transferido al fósforo durante la sulfurización es un azufre sustituido (por ejemplo, -SR) a diferencia de un único átomo de azufre (por ejemplo, -S<sup>-</sup> o =S).

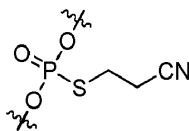
En algunas realizaciones, un reactivo de sulfurización para su uso según la presente invención se caracteriza porque la actividad del reactivo es ajustable modificando el reactivo con un cierto grupo aceptor o donante de electrones.

10 En algunas realizaciones, un reactivo de sulfurización para su uso según la presente invención se caracteriza porque es cristalino. En algunas realizaciones, un reactivo de sulfurización para su uso según la presente invención se caracteriza porque tiene un alto grado de cristalinidad. En ciertas realizaciones, un reactivo de sulfurización para su uso según la presente invención se caracteriza por la facilidad de purificación del reactivo por, por ejemplo, recristalización. En ciertas realizaciones, un reactivo de sulfurización para su uso según la presente invención se caracteriza porque está sustancialmente libre de impurezas que contienen azufre. En algunas realizaciones, los reactivos de sulfurización que están sustancialmente libres de impurezas que contienen azufre muestran una elevada eficiencia.

20 En algunas realizaciones, el oligonucleótido quiralmente controlado proporcionado comprende uno o más enlaces diéster de fosfato. Para sintetizar dichos oligonucleótidos quiralmente controlados, uno o más etapas de modificación opcionalmente sustituidas con una etapa de oxidación para instalar los enlaces diéster de fosfato correspondientes. En algunas realizaciones, la etapa de oxidación se realiza en un modo similar a la síntesis de oligonucleótidos habitual. En algunas realizaciones, una etapa de oxidación comprende el uso de I<sub>2</sub>. En algunas realizaciones, una etapa de oxidación comprende el uso de I<sub>2</sub> y piridina. En algunas realizaciones, una etapa de oxidación comprende el uso de I<sub>2</sub> 0,02 M en un sistema de codisolventes de THF/piridina/agua (70:20:10 - v/v/v). Un ciclo a modo de ejemplo se representa en el Esquema I-c.

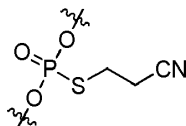
25 En algunas realizaciones, se usa un precursor de fosforotioato para sintetizar oligonucleótidos quiralmente controlados que comprenden enlaces fosforotioato. En algunas realizaciones, dicho precursor de fosforotioato es

30



En algunas realizaciones,

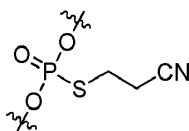
35



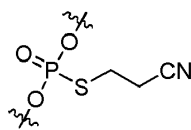
se convierte en enlaces diéster de fosforotioato durante procedimientos habituales de desprotección/liberación después de la salida del ciclo. A continuación se representan ejemplos.

40 En algunas realizaciones, el oligonucleótido quiralmente controlado proporcionado comprende uno o más enlaces diéster de fosfato y uno o más enlaces diéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, el oligonucleótido quiralmente controlado proporcionado comprende uno o más enlaces diéster de fosfato y uno o más enlaces diéster de fosforotioato, en donde al menos un enlace diéster de fosfato se instala después de todos los enlaces diéster de fosforotioato cuando se sintetizan de 3' a 5'. Para sintetizar dichos oligonucleótidos quiralmente controlados, en algunas realizaciones, una o más etapas de modificación se sustituyen opcionalmente con una etapa de oxidación para instalar los enlaces diéster de fosfato correspondientes, y se instala un precursor de fosforotioato para cada uno de los enlaces diéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un precursor de fosforotioato se convierte en un enlace diéster de fosforotioato después de que se logre la longitud de oligonucleótido deseada. En algunas realizaciones, la etapa de desprotección/liberación durante o después de la salida del ciclo convierte los precursores de fosforotioato en enlaces diéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, un precursor de fosforotioato se caracteriza porque tiene la capacidad de ser retirado por una vía de beta-eliminación. En algunas realizaciones, un precursor de fosforotioato es

50

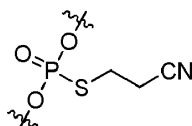


Como se entiende por un experto habitual en la técnica, uno de los beneficios de uso de un precursor de fosfortioato, por ejemplo,



5

durante síntesis es que



10

es más estable que el fosfortioato en ciertas condiciones.

En algunas realizaciones, un precursor de fosfortioato es un grupo protector de fósforo como se describen en el presente documento, por ejemplo, 2-cianoetilo (CE o Cne), 2-trimetilsiletilo, 2-nitroetilo, 2-sulfonietilo, metilo, bencilo, *o*-nitrobencilo, 2-(*p*-nitrofenil)etilo (NPE o Npe), 2-feniletilo, 3-(*N*-*terc*-butilcarboxamido)-1-propilo, 4-oxopentilo, 4-metiltio-1-butilo, 2-ciano-1,1-dimetiletilo, 4-*N*-metilaminobutilo, 3-(2-piridil)-1-propilo, 2-[*N*-metil-*N*-(2-piridil)]aminoetilo, 2-(*N*-formilo,*N*-metil)aminoetilo, 4-[*N*-metil-*N*-(2,2,2-trifluoroacetil)amino]butilo. A continuación se representan ejemplos.

Los métodos de síntesis de un reactivo de sulfurización deseado se describen en el presente documento y en la sección de ejemplos.

Como se observa anteriormente, en algunas realizaciones, la sulfurización ocurre en condiciones que escinden el reactivo quiral del oligonucleótido en crecimiento. En algunas realizaciones, la sulfurización ocurre en condiciones que no escinden el reactivo quiral del oligonucleótido en crecimiento.

En algunas realizaciones, un reactivo de sulfurización se disuelve en un disolvente adecuado y se suministra a la columna. En ciertas realizaciones, el disolvente es un disolvente aprótico polar, tal como un disolvente de nitrilo. En algunas realizaciones, el disolvente es acetonitrilo. En algunas realizaciones, una disolución del reactivo de sulfurización se prepara mezclando un reactivo de sulfurización (por ejemplo, un derivado de tiosulfonato como se describe en el presente documento) con BSTFA (N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida) en un disolvente de nitrilo (por ejemplo, acetonitrilo). En algunas realizaciones, la BSTFA no se incluye. Por ejemplo, los presentes inventores han encontrado que reactivos de sulfurización relativamente más reactivos de la fórmula general  $R^2-S-S(O)_2-R^{S3}$  pueden participar frecuentemente satisfactoriamente en las reacciones de sulfurización en ausencia de BSTFA. Solo para dar un ejemplo, los inventores han demostrado que donde  $R^{S2}$  es *p*-nitrofenilo y  $R^{S3}$  es metilo, entonces no se requiere BSTFA. En vista de la presente divulgación, los expertos en la técnica serán fácilmente capaces de determinar otras situaciones y/o reactivos de sulfurización que no requieren BSTFA.

En algunas realizaciones, la etapa de sulfurización se realiza a temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la etapa de sulfurización se realiza a temperaturas más bajas, tales como aproximadamente 0 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 10 °C, o aproximadamente 15 °C. En algunas realizaciones, la etapa de sulfurización se realiza a temperaturas elevadas superiores a aproximadamente el 20 °C.

En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 120 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 90 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 60 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 30 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 25 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 60 minutos.

En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 5 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 15 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 20 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de

- 5 sulfurización se realiza durante aproximadamente 25 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 30 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 35 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 40 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 45 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 50 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 55 minutos. En algunas realizaciones, una reacción de sulfurización se realiza durante aproximadamente 60 minutos.
- 10 Se encontró inesperadamente que ciertos de los productos de modificación de la sulfurización preparados según los métodos de la presente invención son inesperadamente estable. En algunas realizaciones, los productos inesperadamente estables son los triésteres de fosforotioato. En algunas realizaciones, los productos inesperadamente estables son los oligonucleótidos quiralmente controlados que comprenden uno o más enlaces internucleotídicos que tienen la estructura de la fórmula I-c.
- 15 Un experto de las técnicas relevantes reconocerá que los métodos de sulfurización descritos en el presente documento y los reactivos de sulfurización descritos en el presente documento también son útiles en el contexto de la modificación de los oligonucleótidos de H-fosfonato, tales como los descritos en Wada II (documento de patente WO2010/064146).
- 20 En algunas realizaciones, la reacción de sulfurización tiene una eficiencia de sulfurización escalonada que es al menos aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 %. En algunas realizaciones, la reacción de sulfurización proporciona una composición de producto de dinucleótido en bruto que es al menos del 98 %. En algunas realizaciones, la reacción de sulfurización proporciona una composición de producto de dinucleótido en bruto que es al menos del 90 %. En algunas realizaciones, la reacción de sulfurización proporciona una composición de producto de dinucleótido en bruto que es al menos del 70 %. En algunas realizaciones, la reacción de sulfurización proporciona una composición de producto de dinucleótido en bruto que es al menos del 50 %.
- 25 Una vez ha finalizado la etapa de modificación del fósforo del enlace, el oligonucleótido se somete a otra etapa de desbloqueo en preparación para volver a entrar en el ciclo. En algunas realizaciones, un auxiliar quiral sigue intacto después de la sulfurización y se desbloquea durante la posterior etapa de desbloqueo, que ocurre necesariamente antes de volver a entrar en el ciclo. El proceso de desbloqueo, acoplamiento, terminación y modificación se repiten hasta que el oligonucleótido en crecimiento alcance una longitud deseada, momento en el que el oligonucleótido puede o ser inmediatamente escindido del soporte sólido o dejado unido al soporte para fines de purificación y después se escinde. En algunas realizaciones, uno o más grupos protectores están presentes en una o más de las bases de nucleótidos, y la escisión del oligonucleótido del soporte y la desprotección de las bases ocurre en una única etapa. En algunas realizaciones, uno o más de los grupos protectores están presentes en una o más de las bases de nucleótidos, y la escisión del oligonucleótido del soporte y desprotección de las bases ocurre en más de una etapa. En algunas realizaciones, la desprotección y escisión del soporte ocurre en condiciones básicas usando, por ejemplo, una o más bases de amina. En ciertas realizaciones, la una o más bases de amina comprende propilamina. En ciertas realizaciones, la una o más bases de amina comprende piridina.
- 30 En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 60 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperatura ambiente.
- 35 En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 90 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 80 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperaturas elevadas de aproximadamente 60 °C. En algunas realizaciones, la escisión del soporte y/o la desprotección ocurre a temperatura ambiente.
- 40 Los procedimientos de purificación a modo de ejemplo se describen en el presente documento y/o se conocen, en general, en las técnicas relevantes.
- 45 Es de notar que la retirada del auxiliar quiral del oligonucleótido en crecimiento durante cada ciclo es beneficiosa por al menos los motivos de que (1) el auxiliar no se tendrá que retirar en una etapa separada al final de la síntesis de oligonucleótidos cuando grupos funcionales potencialmente sensibles se instalen en el fósforo; y (2) se evitan productos intermedios auxiliares de fósforo inestables propensos a ser sometidos a reacciones laterales y/o a interferir con la química posterior. Por lo tanto, la retirada del auxiliar quiral durante cada ciclo hace más eficiente la síntesis global.
- 50 Aunque la etapa de desbloqueo en el contexto del ciclo se describe anteriormente, a continuación se incluyen métodos generales adicionales.
- 55
- 60



**Etapa de desbloqueo**

5 En algunas realizaciones, la etapa de acoplamiento va precedida por una etapa de desbloqueo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el grupo hidroxilo en 5' del oligonucleótido en crecimiento se bloquea (es decir, se protege) y debe ser desbloqueado para reaccionar posteriormente con un componente de acoplamiento de nucleósido.

10 En algunas realizaciones, se usa acidificación para retirar un grupo de bloqueo. En algunas realizaciones, el ácido es ácido de Bronsted o ácido de Lewis. Los ácidos de Bronsted útiles son ácidos carboxílicos, ácidos alquilsulfónicos, ácidos arilsulfónicos, ácido fosfórico y sus derivados, ácido fosfónico y sus derivados, ácidos alquilfosfónicos y sus derivados, ácidos arilfosfónicos y sus derivados, ácido fosfónico, ácidos dialquilfosfónicos y ácidos diarilfosfónico que tiene un valor de pKa (25 °C en agua) de -0,6 (ácido trifluoroacético) a 4,76 (ácido acético) en un disolvente orgánico o agua (en el caso de 80 % de ácido acético). La concentración del ácido (1 a 80 %) usada en la etapa de acidificación depende de la acidez del ácido. Se debe tener en cuenta la consideración de la concentración del ácido ya que las condiciones de ácido fuerte producirán despurinación/despirimidinación, en donde las bases de purinilo o pirimidinilo se escinden del anillo de ribosa y u otro anillo de azúcar. En algunas realizaciones, un ácido se selecciona de  $R^{a1}COOH$ ,  $R^{a1}SO_3H$ ,  $R^{a3}SO_3H$ ,



25 en donde cada uno de  $R^{a1}$  y  $R^{a2}$  es independientemente hidrógeno o un alquilo o arilo opcionalmente sustituido, y  $R^{a3}$  es un alquilo o arilo opcionalmente sustituido.

En algunas realizaciones, la acidificación se lleva a cabo por un ácido de Lewis en un disolvente orgánico. A modo de ejemplo, dichos ácidos de Lewis útiles son  $Zn(X^a)_2$  en donde  $X^a$  es Cl, Br, I, o  $CF_3SO_3$ .

30 En algunas realizaciones, la etapa de acidificación comprende añadir una cantidad de un ácido de Bronsted o de Lewis eficaz para retirar un grupo de bloqueo sin retirar los restos de purina del producto intermedio condensado.

35 Los ácidos que son útiles en la etapa de acidificación también incluyen, pero no se limitan a, 10 % de ácido fosfórico en un disolvente orgánico, 10 % de ácido clorhídrico en un disolvente orgánico, 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico, 3 % de ácido dicloroacético o ácido tricloroacético en un disolvente orgánico u 80 % de ácido acético en agua. La concentración de cualquier ácido de Bronsted o de Lewis usada en esta etapa se selecciona de forma que la concentración del ácido no supere una concentración que provoque la escisión de una nucleobase de un resto de azúcar.

40 En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 8 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir 3 % de ácido dicloroacético o ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de ácido dicloroacético o ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir 3 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 10 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir 80 % de ácido acético en agua. En algunas realizaciones, la acidificación comprende añadir aproximadamente 50 % a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 70 %, aproximadamente 50 % a aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 % a aproximadamente 90 % de ácido acético en agua. En algunas realizaciones, la acidificación comprende la adición adicional de secuestrantes de cationes a un ácido disolvente. En ciertas realizaciones, los secuestrantes de cationes pueden ser trietilsilano o triisopropilsilano. En algunas realizaciones, un grupo de bloqueo se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 1 % de ácido trifluoroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, un grupo de bloqueo se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 3 % de ácido dicloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, un grupo de bloqueo se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 3 % de ácido tricloroacético en un disolvente orgánico. En algunas realizaciones, un grupo de bloqueo se desbloquea por acidificación, que comprende añadir 3 % de ácido tricloroacético en diclorometano.

En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención se completan en un sintetizador y la etapa de desbloqueo del grupo hidroxilo del oligonucleótido en crecimiento comprende suministrar una cantidad de disolvente a la columna del sintetizador, columna que contiene un soporte sólido al que está unido el oligonucleótido. En algunas realizaciones, el disolvente es un disolvente halogenado (por ejemplo, diclorometano). En ciertas realizaciones, el disolvente comprende una cantidad de un ácido. En algunas realizaciones, el disolvente comprende una cantidad de un ácido orgánico tal como, por ejemplo, ácido tricloroacético. En ciertas realizaciones, el ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % p/v. En ciertas realizaciones, el ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 10 % p/v. En ciertas realizaciones, el ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 % p/v. En ciertas realizaciones, el ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 % p/v. En ciertas realizaciones, el ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 3 % peso/volumen. Los métodos de desbloqueo de un grupo hidroxilo se describen más en el presente documento. En algunas realizaciones, el ácido que está presente en 3 % p/v es diclorometano.

En algunas realizaciones, el auxiliar quiral se retira antes de la etapa de desbloqueo. En algunas realizaciones, el auxiliar quiral se retira durante la etapa de desbloqueo.

En algunas realizaciones, la salida del ciclo se realiza antes de la etapa de desbloqueo. En algunas realizaciones, la salida del ciclo se realiza después de la etapa de desbloqueo.

### 20 **Condiciones generales para la retirada de grupos de bloqueo/grupos protectores**

Los grupos funcionales, tales como restos hidroxilo o amino, que se localizan en nucleobases o restos de azúcar se bloquean rutinariamente con grupos (restos) de bloqueo (protectores) durante la síntesis y posteriormente se desbloquean. En general, un grupo de bloqueo convierte una funcionalidad química de una molécula inerte en condiciones de reacción específicas y después se puede retirar de dicha funcionalidad en una molécula sin dañar sustancialmente el resto de la molécula (véase, por ejemplo, Green and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 2<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 1991). Por ejemplo, los grupos amino se pueden bloquear con grupos de bloqueo de nitrógeno, tales como ftalimido, 9-fludrenilmetoxicarbonilo (FMOC), trifenilmetilsulfenilo, *t*-BOC, 4,4'-dimetoxitritilo (DMTr), 4-metoxitritilo (MMTr), 9-fenilxantín-9-ilo (Pixyl), tritilo (Tr), o 9-(*p*-metoxifenil)xantín-9-ilo (MOX). Los grupos carboxilo se pueden proteger como grupos acetilo. Los grupos hidroxilo se pueden proteger, tales como tetrahidropirano (THP), *t*-butildimetilsililo (TBDMS), 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-ilo (Ctmp), 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-ilo (Fmp), 1-(2-cloroetoxi)etilo, 3-metoxi-1,5-dicarbometoxipentan-3-ilo (MDP), bis(2-acetoxietoxi)metilo (ACE), triisopropilsililoximetilo (TOM), 1-(2-cianoetoxi)etilo (CEE), 2-cianoetoximetilo (CEM), [4-(*N*-dicloroacetil-*N*-metilamino)benciloxi]metilo, 2-cianoetilo (CN), pivaloiloximetilo (PivOM), levuniloximetilo (ALE). Se han descrito otros grupos de bloqueo de hidroxilo representativos (véase, por ejemplo, Beaucage et al., Tetrahedron, 1992, 46, 2223). En algunas realizaciones, los grupos de bloqueo de hidroxilo son grupos lábiles al ácido, tales como tritilo, monometoxitritilo, dimetoxitritilo, trimetoxitritilo, 9-fenilxantín-9-ilo (Pixyl) y 9-(*p*-metoxifenil)xantín-9-ilo (MOX). Los grupos funcionales químicos también se pueden bloquear incluyéndolos en una forma de precursor. Por lo tanto, un grupo azido se puede considerar una forma de bloqueo de una amina ya que el grupo azido se convierte fácilmente en la amina. Se conocen grupos protectores representativos adicionales utilizados en la síntesis de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Agrawal et al., Protocols for Oligonucleotide Conjugates, Eds., Humana Press, New Jersey, 1994, Vol. 26, pp. 1-72).

Se conocen y usan diversos métodos para la retirada de grupos de bloqueo de ácidos nucleicos. En algunas realizaciones, se retiran todos los grupos de bloqueo. En algunas realizaciones, se retira una porción de los grupos de bloqueo. En algunas realizaciones, se pueden ajustar las condiciones de reacción para retirar selectivamente ciertos grupos de bloqueo.

En algunas realizaciones, los grupos de bloqueo de nucleobases, si están presentes, son escindibles con un reactivo ácido después del ensamblaje de un oligonucleótido proporcionado. En alguna realización, los grupos de bloqueo de nucleobases, si están presentes, son escindibles en condiciones ni ácidas ni básicas, por ejemplo, escindibles con sales de fluoruro o complejos de ácido fluorhídrico. En algunas realizaciones, los grupos de bloqueo de nucleobases, si están presentes, son escindible en presencia de base o un disolvente básico después del ensamblaje de un oligonucleótido proporcionado. En ciertas realizaciones, uno o más de los grupos de bloqueo de nucleobases se caracterizan porque son escindibles en presencia de base o un disolvente básico después del ensamblaje de un oligonucleótido proporcionado, pero son estables a las condiciones particulares de una o más etapas de desprotección tempranas que ocurren durante el ensamblaje del oligonucleótido proporcionado.

En algunas realizaciones, no se requieren grupos de bloqueo para las nucleobases. En algunas realizaciones, se requieren grupos de bloqueo para las nucleobases. En algunas realizaciones, ciertas nucleobases requieren uno o más grupo de bloqueos mientras que otras nucleobases no requieren uno o más grupos de bloqueo.

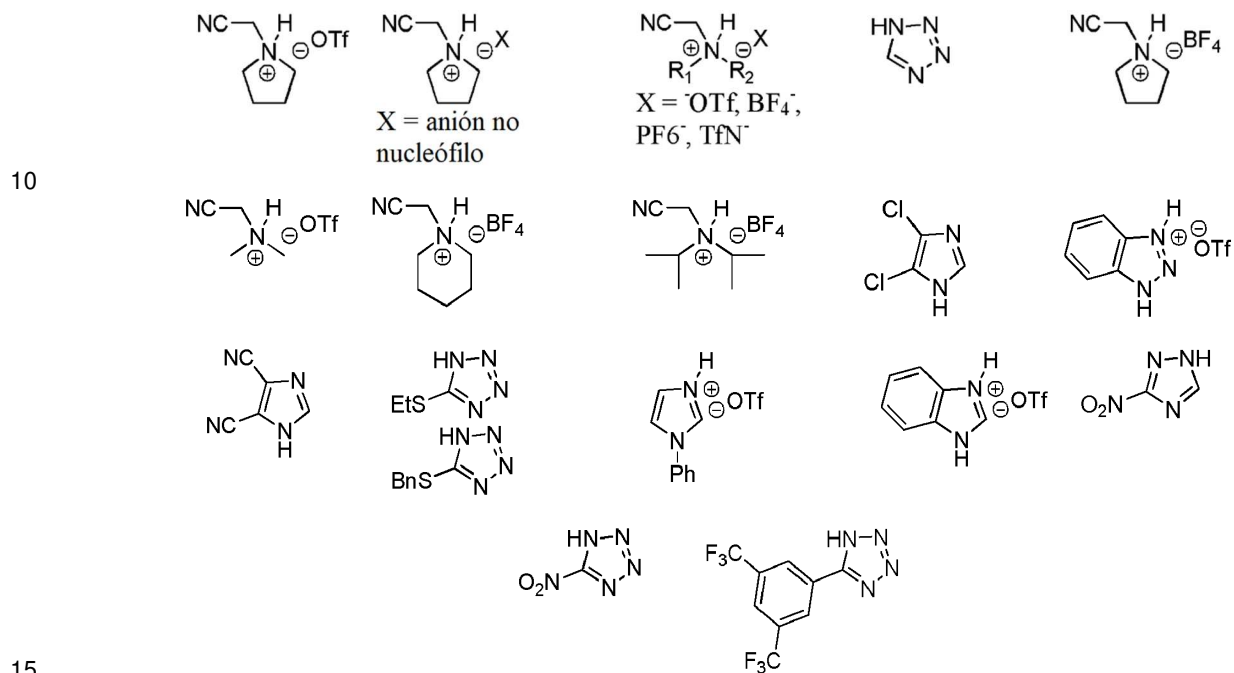
En algunas realizaciones, el oligonucleótido se escinde del soporte sólido después de la síntesis. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido comprende el uso de propilamina. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido comprende el uso de propilamina en piridina. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido

- comprende el uso de 20 % de propilamina en piridina. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido comprende el uso de propilamina en piridina anhidra. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido comprende el uso de 20 % de propilamina en piridina anhidra. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido comprende uso de un disolvente aprótico polar, tal como acetonitrilo, NMP, DMSO, sulfona y/o lutidina. En algunas realizaciones, la escisión del soporte sólido comprende el uso de disolvente, por ejemplo, un disolvente aprótico polar, y una o más aminas primarias (por ejemplo, una amina C<sub>1-10</sub>), y/o uno o más de metoxilamina, hidracina y amoniaco anhidro puro.
- En algunas realizaciones, la desprotección del oligonucleótido comprende el uso de propilamina. En algunas realizaciones, la desprotección del oligonucleótido comprende el uso de propilamina en piridina. En algunas realizaciones, la desprotección del oligonucleótido comprende el uso de 20 % de propilamina en piridina. En algunas realizaciones, la desprotección del oligonucleótido comprende el uso de propilamina en piridina anhidra. En algunas realizaciones, la desprotección del oligonucleótido comprende el uso de 20 % de propilamina en piridina anhidra.
- En algunas realizaciones, el oligonucleótido se desprotege durante la escisión.
- En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente temperatura ambiente. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura elevada. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a por encima de aproximadamente 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70°C, 80 °C 90 °C o 100 °C. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente 30 °C, 40 °C, 50 °C, 60 °C, 70°C, 80 °C 90 °C o 100 °C. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente 40-80 °C. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente 50-70 °C. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente 60 °C.
- En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante más de 0,1 h, 1 h, 2 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 24 h, 30 h o 40 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 0,1-5 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 3-10 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 5-15 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 10-20 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 15-25 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 20-40 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 2 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 5 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 10 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 15 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 18 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza durante aproximadamente 24 h.
- En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura ambiente durante más de 0,1 h, 1 h, 2 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 24 h, 30 h o 40 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura ambiente durante aproximadamente 5-48 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura ambiente durante aproximadamente 10-24 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura elevada durante más de 0,1 h, 1 h, 2 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 24 h, 30 h o 40 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a temperatura elevada durante aproximadamente 0,5-5 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 0,5-5 h. En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido, se realiza a aproximadamente 60 °C durante aproximadamente 2 h.
- En algunas realizaciones, la escisión del oligonucleótido del soporte sólido, o la desprotección del oligonucleótido comprende el uso de propilamina y se realiza a temperatura ambiente o temperatura elevada durante más de 0,1 h, 1 h, 2 h, 5 h, 10 h, 15 h, 20 h, 24 h, 30 h o 40 h. Las condiciones a modo de ejemplo son 20 % de propilamina en piridina

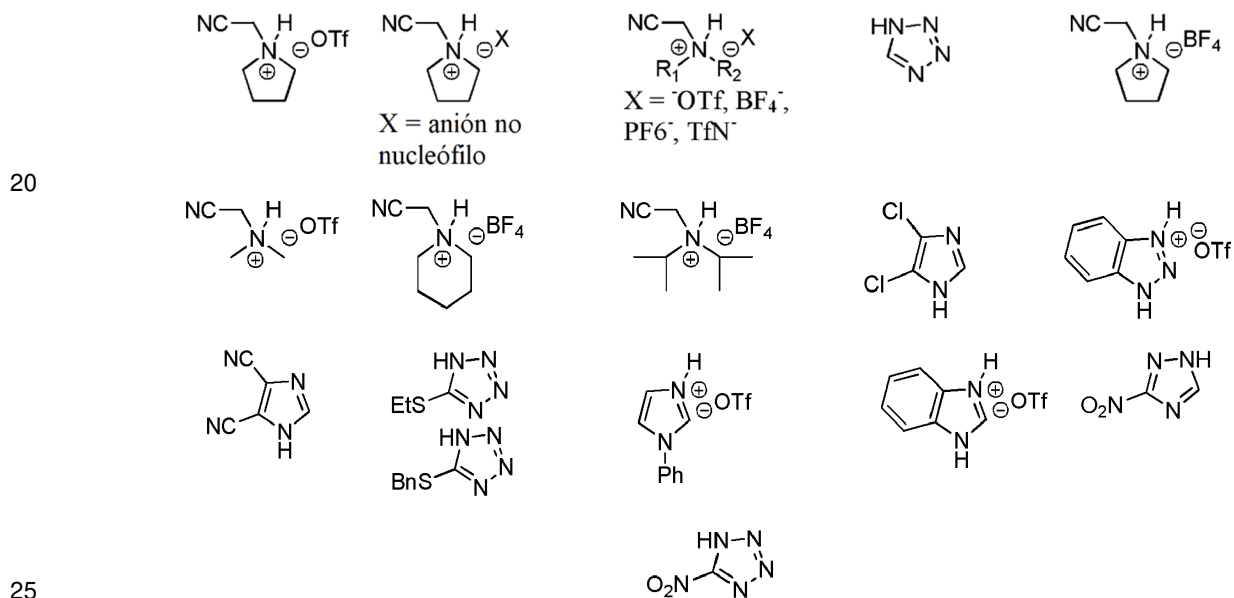
a temperatura ambiente durante aproximadamente 18 h, y 20 % de propilamina en piridina a 60 °C durante aproximadamente 18 h.

En algunas realizaciones, un activador s un activador de "Wada", es decir, el activador es de uno cualquiera de los documentos de Wada I, II o III citados anteriormente.

Los grupos activadores a modo de ejemplo se representan a continuación:

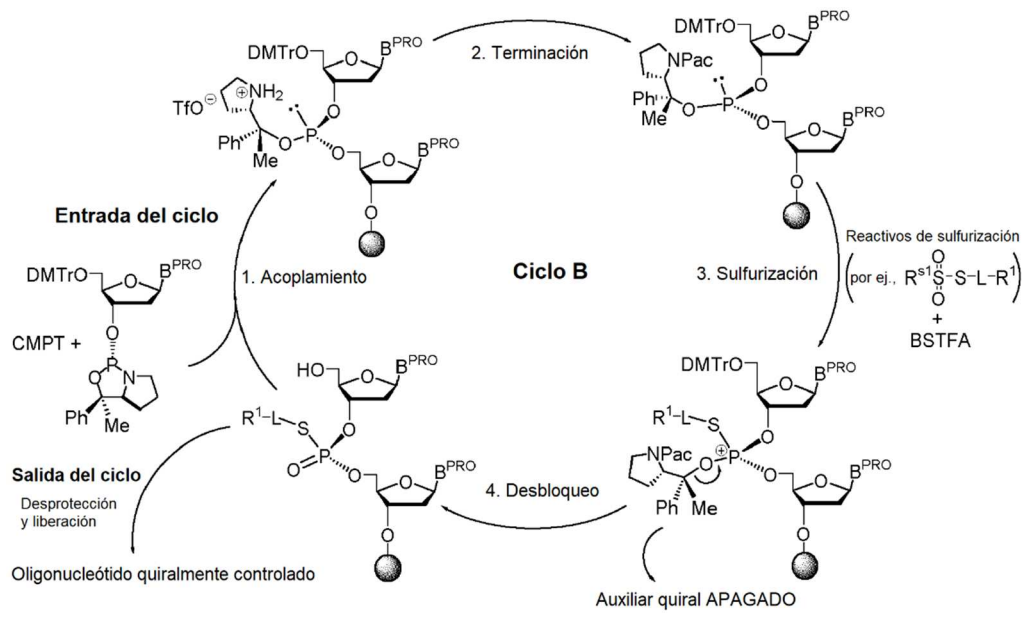


En algunas realizaciones, un reactivo de activación se selecciona de



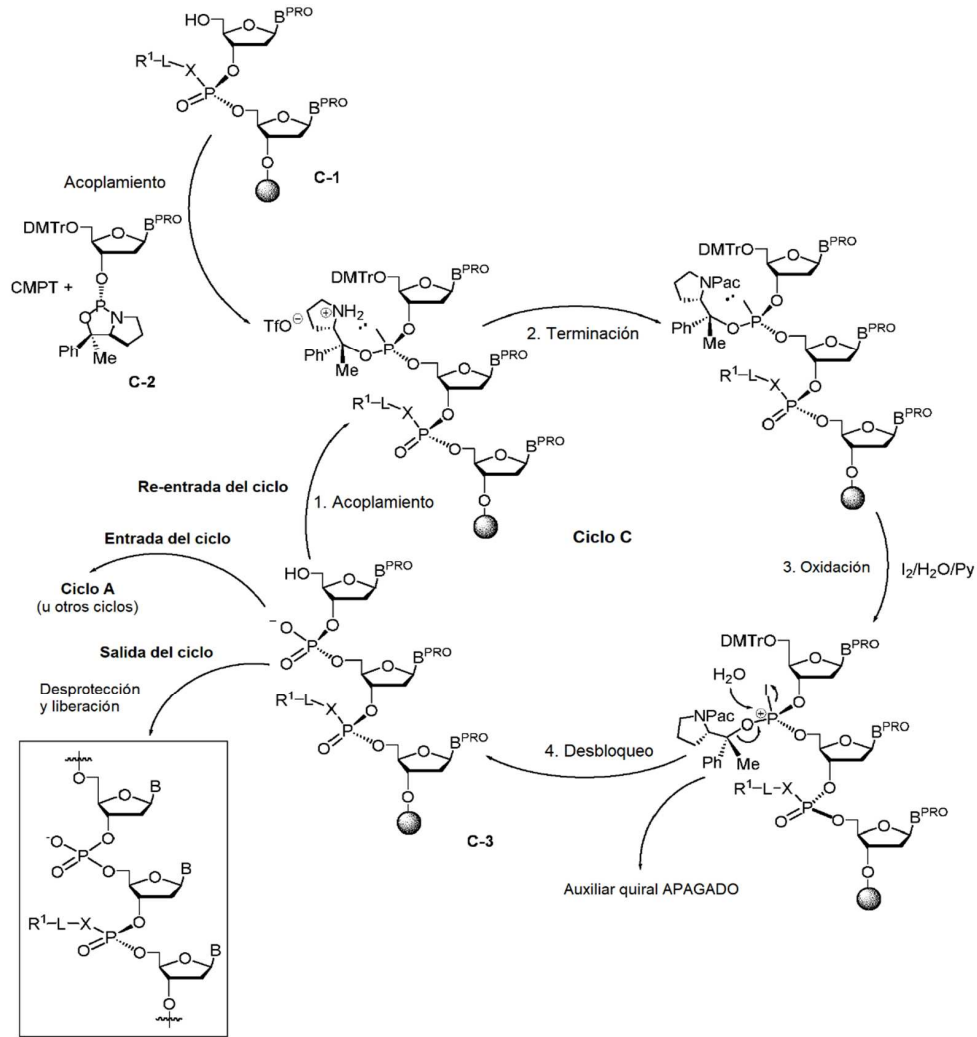
Un ciclo a modo de ejemplo se representa en el Esquema I-b.

Esquema I-b. Instalación de enlaces de fosforotioato.



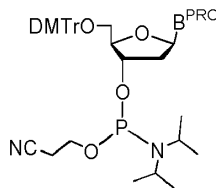
Un ciclo a modo de ejemplo se ilustra en el Esquema I-c.

**Esquema I-c.** Instalación de tanto enlaces diéster de fosfato como internucleotídicos modificados en un oligonucleótido quiralmemente controlado.



5 En el Esquema I-c, el oligonucleótido (o nucleótido, u oligonucleótido con enlace internucleotídico modificado) en el soporte sólido (C-1) se acopla con fosforamidito C-2. Después del acoplamiento y la terminación, se realiza una etapa de oxidación. Después del desbloqueo, se forma un enlace diéster de fosfato. El producto del ciclo C-3 pueden o volver a entrar en el ciclo C para instalar más enlaces diéster de fosfato, o entrar en otros ciclos para instalar otros tipos de enlaces internucleotídicos, o ir a la salida del ciclo.

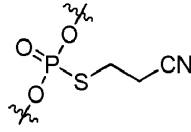
10 En algunas realizaciones, se puede usar fosforamidito no quiralmemente puro en lugar de C-2 en el Esquema I-c. En algunas realizaciones, se usan  $\beta$ -cianoetilfosforamiditos protegidos con DMTr. En algunas realizaciones, el fosforamidito que se usa tiene la estructura de



15 En algunas realizaciones, el uso de un diéster de precursor de fosforotioato aumenta la estabilidad del oligonucleótido durante síntesis. En algunas realizaciones, el uso de un diéster de precursor de fosforotioato mejora la eficiencia de la síntesis de oligonucleótidos quiralmemente controlados. En algunas realizaciones, el uso de un diéster de precursor de fosforotioato mejora el rendimiento de la síntesis de oligonucleótidos quiralmemente controlados. En algunas realizaciones, el uso de un diéster de precursor de fosforotioato mejora la pureza de productos de la síntesis de oligonucleótidos quiralmemente controlados.

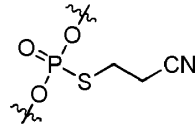
20

En algunas realizaciones, el precursor de diéster de fosforitoato en los métodos anteriormente mencionados es



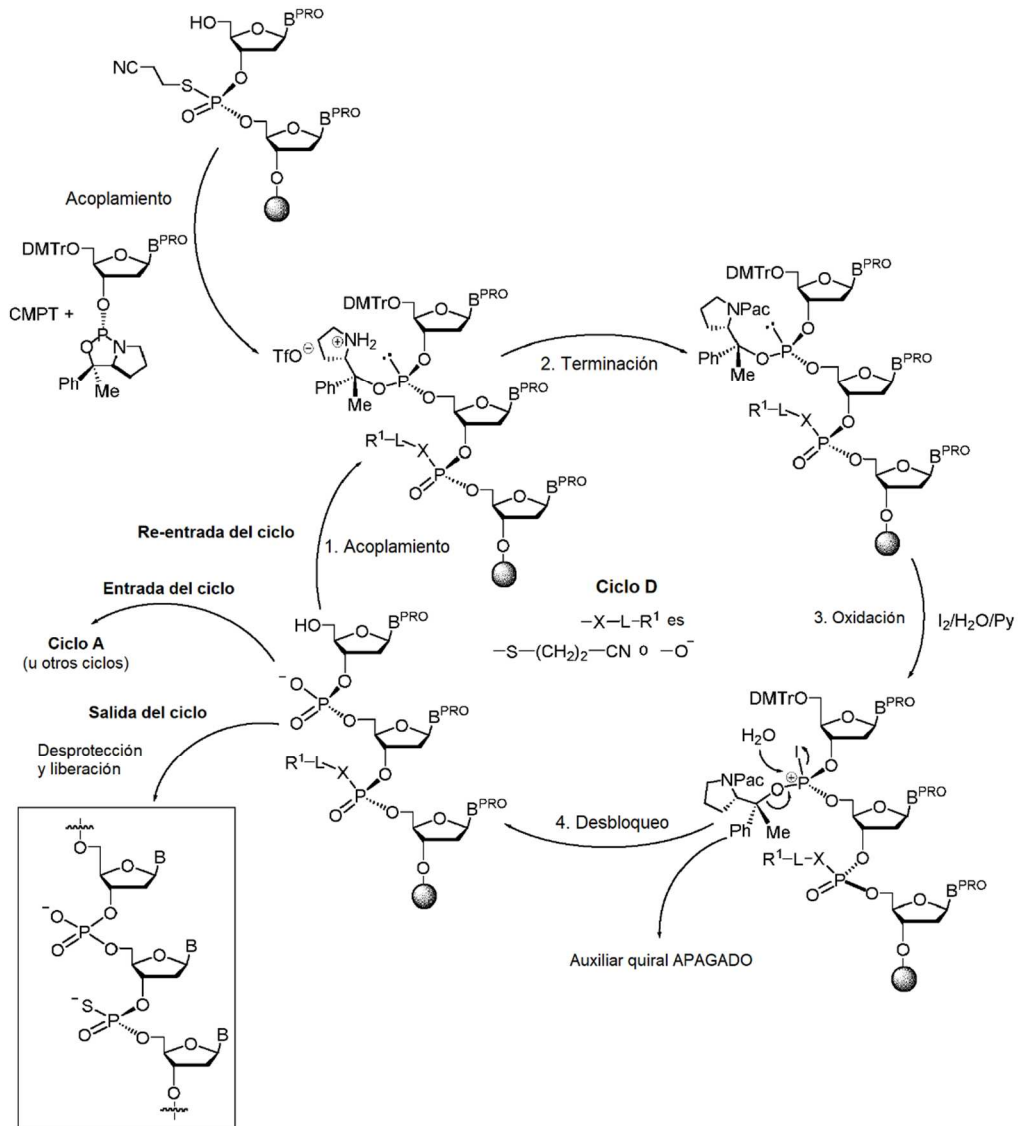
5

En algunas realizaciones,



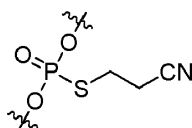
10 se convierte en un enlace diéster de fosforitoato durante la desprotección/liberación. Un ciclo a modo de ejemplo se representa en el Esquema I-d. Más ejemplos se representan a continuación.

Esquema I-d. Precursor de diéster de fosforitoato en la síntesis de oligonucleótidos quiralmnte controlados.



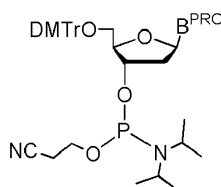
15

Como se ilustra en el Esquema I-d, tanto los enlaces diéster de fosforotioato como de fosfato se pueden incorporar en el mismo oligonucleótido quiralmente controlado. Como entiende un experto habitual en la técnica, los métodos proporcionados no requieren que el diéster de fosforotioato y el diéster de fosfato sean consecutivos – se pueden formar otros enlaces internucleotídicos entre ellos usando un ciclo como se ha descrito anteriormente. En el Esquema I-d, los precursores de diéster de fosforotioato,



, se instalan en lugar de los enlaces diéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, dicha sustitución proporcionada aumentó la eficiencia de síntesis durante ciertas etapas, por ejemplo, la etapa de oxidación. En algunas realizaciones, el uso de precursores de diéster de fosforotioato mejora, en general, la estabilidad de oligonucleótidos quiralmente controlados durante la síntesis y/o el almacenamiento. Después de la salida del ciclo, durante la desprotección/liberación, el precursor de diéster de fosforotioato se convierte en el enlace diéster de fosforotioato. En algunas realizaciones, es beneficioso usar el precursor de diéster de fosforotioato incluso cuando no esté presente enlace diéster de fosfato en el oligonucleótido quiralmente controlado, o no se requiera etapa de oxidación durante la síntesis.

Como en el Esquema I-c, en algunas realizaciones, se puede usar fosforamidito no quiralmente puro para ciclos que comprenden etapas de oxidación. En algunas realizaciones, se usan  $\beta$ -cianoetilfosforamiditos protegidos con DMTr. En algunas realizaciones, el fosforamidito que se usa tiene la estructura de



En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención proporcionan composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados que están enriquecidos en un tipo de oligonucleótido particular.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 20 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 30 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 40 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 60 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 70 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 80 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 90 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 95 % de una composición en bruto proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular.

En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 1 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 2 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 3 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 4 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 5 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 10 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 20 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 30 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 40 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 50 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 60 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 70 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 80 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En



algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 90 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular. En algunas realizaciones, al menos aproximadamente el 95 % de una composición proporcionada es de un tipo de oligonucleótido particular.

##### 5 **Aplicaciones biológicas y uso a modo de ejemplo**

Entre otras cosas, la presente invención reconoce que las propiedades y actividades de un oligonucleótido se pueden ajustar por optimización de su patrón de centros quirales del esqueleto mediante el uso de composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionadas. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados, en donde los oligonucleótidos tienen un patrón común de centros quirales del esqueleto que potencia su estabilidad y/o actividad biológica. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona una estabilidad inesperadamente elevada. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto, sorprendentemente, proporciona actividad enormemente elevada. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto proporciona tanto una elevada estabilidad como actividad. En algunas realizaciones, cuando un oligonucleótido se utiliza para escindir un polímero de ácido nucleico, un patrón de centros quirales del esqueleto del oligonucleótido, sorprendentemente por sí mismo, cambia el patrón de escisión de un polímero de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto previene eficazmente la escisión en sitios secundarios. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto crea nuevos sitios de escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto minimiza el número de sitios de escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto minimiza el número de sitios de escisión de manera que un polímero de ácido nucleico diana se escinda en solo un sitio dentro de la secuencia del polímero de ácido nucleico diana que es complementaria al oligonucleótido. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto potencia la eficiencia de escisión en un sitio de escisión. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto del oligonucleótido mejora la escisión de un polímero de ácido nucleico diana. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto aumenta la selectividad. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto minimiza el efecto inespecífico. En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto aumenta la selectividad, por ejemplo, la selectividad de la escisión entre secuencias diana que se diferencian por mutaciones puntuales o polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). En algunas realizaciones, un patrón de centros quirales del esqueleto aumenta la selectividad, por ejemplo, la selectividad de la escisión entre secuencias diana que se diferencia por solo una mutación puntual o polimorfismo de un solo nucleótido (SNP).

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de escisión controlada de un polímero de ácido nucleico, que comprende proporcionar una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes, en donde la secuencia de bases común es o comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia encontrada en el polímero de ácido nucleico;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto; y

en donde el polímero de ácido nucleico se escinde en un patrón de escisión que es diferente del patrón de escisión cuando se proporciona la composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados.

Como se usa en el presente documento, un patrón de escisión de un polímero de ácido nucleico se define por el número de sitios de escisión, las localizaciones de los sitios de escisión y el porcentaje de escisión en cada sitio. En algunas realizaciones, un patrón de escisión tiene múltiples sitios de escisión, y el porcentaje de escisión en cada sitio es diferente. En algunas realizaciones, un patrón de escisión tiene múltiples sitios de escisión, y el porcentaje de escisión en cada sitio es el mismo. En algunas realizaciones, un patrón de escisión tiene solo un sitio de escisión. En algunas realizaciones, los patrones de escisión se diferencian entre sí en que tienen diferentes números de sitios de escisión. En algunas realizaciones, los patrones de escisión se diferencian entre sí en que al menos una localización de escisión es diferente. En algunas realizaciones, los patrones de escisión se diferencian entre sí en que el porcentaje de escisión en al menos un sitio de escisión común es diferente. En algunas realizaciones, los patrones de escisión se diferencian entre sí en que tienen diferentes números de sitios de escisión, y/o al menos una localización de escisión es diferente, y/o el porcentaje de escisión en al menos un sitio de escisión común es diferente.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de escisión controlada de un polímero de ácido nucleico, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto un polímero de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende una secuencia diana con una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 5 1) una secuencia de bases y longitud comunes, en donde la secuencia de bases común es o comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia diana encontrada en el polímero de ácido nucleico;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 10 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmemente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la secuencia y longitud de bases particular, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular.

15 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de escisión controlada de un polímero de ácido nucleico, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto un polímero de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos comprende una secuencia diana con una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 20 1) una secuencia de bases y longitud comunes, en donde la secuencia de bases común es o comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia diana encontrada en el polímero de ácido nucleico;
- 25 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

30 composición que está quiralmemente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la secuencia y longitud de bases particular, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular, siendo la puesta en contacto realizada en condiciones tales que ocurra la escisión del polímero de ácido nucleico.

35 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de cambio de un primer patrón de escisión de un polímero de ácido nucleico que resulta de usar una primera composición de oligonucleótidos, que comprende proporcionar una segunda composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 40 1) una secuencia de bases y longitud comunes, en donde la secuencia de bases común es o comprende una secuencia que es complementaria a una secuencia encontrada en el polímero de ácido nucleico;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 45 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto; y

50 en donde el polímero de ácido nucleico se escinde en un patrón de escisión que es diferente del primer patrón de escisión.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un método de alteración de un patrón de escisión observado cuando un polímero de ácido nucleico cuya secuencia de nucleótidos incluye una secuencia diana se pone en contacto con una composición de oligonucleótidos de referencia que comprende oligonucleótidos que tienen una secuencia y longitud de bases particular, cuya secuencia de bases particular es o comprende una secuencia que es complementaria a la secuencia diana, comprendiendo el método:

60 poner en contacto el polímero de ácido nucleico con una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados de oligonucleótidos que tienen la secuencia y longitud de bases particular, composición que está quiralmemente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la secuencia y longitud de bases particular, en oligonucleótidos de un único tipo de oligonucleótido caracterizados por:

- 65 1) la secuencia y longitud de bases particular;
- 2) a particular patrón de enlaces del esqueleto; y

3) a particular patrón de centros quirales del esqueleto,

siendo la puesta en contacto realizada en condiciones tales que ocurra la escisión del polímero de ácido nucleico.

- 5 En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada reduce el número de sitios de escisión dentro de la secuencia diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada proporciona la escisión de un único sitio dentro de la secuencia diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporciona una tasa de escisión potenciada en un sitio de escisión dentro de la secuencia diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporciona una eficiencia potenciada en un sitio de escisión dentro de la secuencia diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporciona una elevada renovación en la escisión de un polímero de ácido nucleico diana.
- 10
- 15 En algunas realizaciones, la escisión ocurrida con un patrón de escisión se diferencia de un patrón de escisión de referencia. En algunas realizaciones, un patrón de escisión de referencia es uno observado cuando un polímero de ácido nucleico se pone en contacto en condiciones comparables con una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos de referencia es una composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados (por ejemplo, estereoaleatoria) de oligonucleótidos que comparte la secuencia de bases y longitud comunes de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos de referencia es una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que comparte la secuencia y longitud común.
- 20
- 25 En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico es ARN. En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico es un oligonucleótido. En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico es un oligonucleótido de ARN. En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico es un transcrito. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada forman dúplex con un polímero de ácido nucleico a escindir.
- 30
- 35 En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico se escinde por una enzima. En algunas realizaciones, una enzima escinde un dúplex formado por un polímero de ácido nucleico. En algunas realizaciones, una enzima es RNasa H. En algunas realizaciones, una enzima es Dicer. En algunas realizaciones, una enzima es una proteína Argonaute. En algunas realizaciones, una enzima es Ago2. En algunas realizaciones, una enzima está dentro de un complejo de proteína. Un complejo de proteína a modo de ejemplo es el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).
- 40
- 45 En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada que comprende oligonucleótidos con un patrón común de centros quirales del esqueleto proporciona selectividad inesperadamente alta, de manera que los polímeros de ácido nucleico que tienen solo pequeñas variaciones de secuencia dentro de una región diana pueden ser selectivamente elegidos. En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico es un transcrito de un alelo. En algunas realizaciones, los transcritos de diferentes alelos pueden ser selectivamente elegidos por composiciones de oligonucleótido quiralmente controlado proporcionado.
- 50
- 55 En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionadas y los métodos de las mismas permite el control preciso de sitios de escisión dentro de una secuencia diana. En algunas realizaciones, un sitio de escisión está alrededor de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está en la dirección 5' de y cerca de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 5 pares de bases en la dirección 5' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 4 pares de bases en la dirección 5' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 3 pares de bases en la dirección 5' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 2 pares de bases en la dirección 5' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 1 par de bases en la dirección 5' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está en la dirección 3' de y cerca de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 5 pares de bases en la dirección 3' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 4 pares de bases en la dirección 3' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 3 pares de bases en la dirección 3' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 2 pares de bases en la dirección 3' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . En algunas realizaciones, un sitio de escisión está dentro de 1 par de bases en la dirección 3' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . Entre otras cosas, Por lo tanto, la presente invención proporciona control de sitios de escisión con en una secuencia diana. En algunas realizaciones, una escisión a modo de ejemplo se representa en la Figura 21. En algunas realizaciones, la escisión representada en la Figura 21 se designa como la escisión en un sitio dos pares de bases en la dirección 3' de una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$ . Como se describe ampliamente en la presente divulgación, una secuencia de centros quirales del esqueleto  $R_pSpSp$  se puede encontrar en una única unidad o
- 60
- 65

unidades repetidas de  $(Np)m(Rp)n(Sp)t$ ,  $(Np)t(Rp)n(Sp)m$ ,  $(Sp)m(Rp)n(Sp)t$ ,  $(Sp)t(Rp)n(Sp)m$ ,  $(Rp)n(Sp)m$ ,  $(Rp)m(Sp)n$ ,  $(Sp)mRp$  y/o  $Rp(Sp)m$ , cada una de las cuales es independientemente como se ha definido anteriormente y se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada crea un nuevo sitio de escisión 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana (por ejemplo, véase la Figura 21), en donde dicho nuevo sitio de escisión no existe si se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia (no se puede detectar). En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio de escisión 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana (por ejemplo, véase la Figura 21), en donde la escisión en dicho sitio ocurre a un mayor porcentaje que cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia. En algunas realizaciones, la escisión en dicho sitio por una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 o 1000 veces de aquella por una composición de oligonucleótidos de referencia (por ejemplo, cuando se mide por porcentaje de escisión a un sitio). En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión acelerada en un sitio de escisión 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana (por ejemplo, véase la Figura 21), en comparación con cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia. En algunas realizaciones, la escisión por una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 o 1000 veces más rápida que aquella por una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana (por ejemplo, véase la Figura 21) es un sitio de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana (por ejemplo, véase la Figura 21) está dentro de un par de bases de un sitio de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana (por ejemplo, véase la Figura 21) está dentro de 2 pares de bases de un sitio de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia. En algunas realizaciones, está dentro de 3 pares de bases. En algunas realizaciones, está dentro de 4 pares de bases. En algunas realizaciones, está dentro de 5 pares de bases. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana es uno de los principales sitios de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia. En algunas realizaciones, dicho sitio es el sitio de escisión con el mayor porcentaje de escisión cuando una referencia (por ejemplo, quiralmente no controlados) composición de oligonucleótidos se usa. En algunas realizaciones, un sitio de escisión de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada 2 pares de bases en la dirección 3' de centros quirales del esqueleto  $RpSpSp$  en una molécula diana es uno de los sitios de escisión con mayor tasa de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos de referencia (por ejemplo, quiralmente no controlados). En algunas realizaciones, dicho sitio es el sitio de escisión con la mayor tasa de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados) de referencia.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en uno o más sitios, por ejemplo, con respecto a una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados/estereoaleatorios) de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia selectivamente la escisión en un único sitio con respecto a una composición de referencia (por ejemplo, quiralmente no controlados/estereoaleatorios). En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados potencia la escisión en un sitio proporcionando una mayor tasa de escisión. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados potencia la escisión en un sitio proporcionando un mayor porcentaje de escisión en dicho sitio. El porcentaje de escisión en un sitio se puede determinar por diversos métodos ampliamente conocidos y puestos en práctica en la técnica. En algunas realizaciones, el porcentaje de escisión en un sitio se determina por análisis de productos de escisión, por ejemplo, como por HPLC-EM como se ilustra en la Figura 18, Figura 19 y Figura 30; véanse también los mapas de escisión a modo de ejemplo, tales como la Figura 9, Figura 10, Figura 11, Figura 14, Figura 22, Figura 25 y Figura 26. En algunas realizaciones, el potenciamiento es con respecto a una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, el potenciamiento es con respecto a otro sitio de escisión. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio que es un sitio de escisión preferido de una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión preferido, o un grupo de sitios de escisión preferidos, es un sitio o sitios que tienen un porcentaje de escisión relativamente mayor en comparación con uno o varios de otros sitios de escisión. En algunas realizaciones, los sitios de escisión preferidos pueden indicar preferencia de una enzima. Por ejemplo, para RNasa H, cuando se usa un oligonucleótido de ADN, los sitios de escisión resultantes pueden indicar preferencia de RNasa H. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio que es un sitio de escisión preferido de una enzima. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio que no es un

sitio de escisión preferido de una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio que no es un sitio de escisión de una composición de oligonucleótidos de referencia, creando eficazmente un nuevo sitio de escisión que no existe cuando se usa una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio dentro de 5 pares de bases de una mutación o SNP elegida, lo que aumenta la escisión selectiva del oligonucleótido diana no deseado. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio dentro de 4 pares de bases de una mutación o SNP elegida, lo que aumenta la escisión selectiva del oligonucleótido diana no deseado. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio dentro de 3 pares de bases de una mutación o SNP elegida, lo que aumenta la escisión selectiva del oligonucleótido diana no deseado. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio dentro de 2 pares de bases de una mutación o SNP elegida, lo que aumenta la escisión selectiva del oligonucleótido diana no deseado. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión en un sitio inmediatamente en la dirección 5' o en la dirección 3' de la mutación o SNP elegida, lo que aumenta la escisión selectiva del oligonucleótido diana no deseado (por ejemplo, Figura 22, Panel D, ARNm).

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime la escisión en uno o más sitios, por ejemplo, con respecto a una composición de oligonucleótidos (por ejemplo, quiralmente no controlados/estereoaleatorios) de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime selectivamente la escisión en el único sitio con respecto a una composición de referencia (por ejemplo, quiralmente no controlados/estereoaleatorios). En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados suprime la escisión en un sitio proporcionando una menor tasa de escisión. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados suprime la escisión en un sitio proporcionando un menor porcentaje de la escisión en dicho sitio. En algunas realizaciones, la supresión es con respecto a una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, la supresión es con respecto a otro sitio de escisión. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime la escisión en un sitio que es un sitio de escisión preferido de una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, un sitio de escisión preferido, o un grupo de sitios de escisión preferidos, es un sitio o sitios que tienen un porcentaje de escisión relativamente mayor en comparación con uno o varios de otros sitios de escisión. En algunas realizaciones, los sitios de escisión preferidos pueden indicar preferencia de una enzima. Por ejemplo, para RNasa H, cuando se usa un oligonucleótido de ADN, los sitios de escisión resultantes pueden indicar una preferencia de RNasa H. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime la escisión en un sitio que es un sitio de escisión preferido de una enzima. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime la escisión en un sitio que no es un sitio de escisión preferido de una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime todos los sitios de escisión de una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia, en general, la escisión de oligonucleótidos diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada suprime, en general, la escisión de oligonucleótidos no diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada potencia la escisión de oligonucleótidos diana y suprime la escisión de oligonucleótidos no diana. Usando la Figura 22, Panel D, como un ejemplo, un oligonucleótido diana para escisión es ARNm, mientras que un oligonucleótido no diana tiene ARNwt. En un sujeto que comprende un tejido enfermo que comprende una mutación o SNP, un oligonucleótido diana para la escisión puede ser transcrito con una mutación o SNP, mientras que un oligonucleótido no diana pueden ser transcritos normales sin una mutación o SNP, tal como los expresados en tejidos sanos.

En algunas realizaciones, además de los patrones de centros quirales del esqueleto descritos en el presente documento, los oligonucleótidos proporcionados comprenden opcionalmente bases modificadas, azúcares modificados, enlaces del esqueleto modificados y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado tiene un unímero, altmero, blockmero, gápmero, hemímero y skipmero. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado comprende uno o más restos de unímero, altmero, blockmero, gápmero, hemímero o skipmero, o cualquier combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, además de los patrones de centros quirales del esqueleto en el presente documento, un oligonucleótido proporcionado tiene un hemímero. En algunas realizaciones, además de los patrones de centros quirales del esqueleto en el presente documento, un oligonucleótido proporcionado tiene un 5'-hemímero con restos de azúcar modificados. En algunas realizaciones, un oligonucleótido proporcionado tiene 5'-hemímero con restos de azúcar modificados en 2'. Las modificaciones adecuadas son ampliamente conocidas en la técnica, por ejemplo, las descritas en la presente solicitud. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-F. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-MOE. En algunas realizaciones, una modificación es s-cEt.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de una secuencia del ácido nucleico diana para la que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada una de las cuales contiene un elemento de secuencia característico de

nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos de la misma secuencia del ácido nucleico diana, comprendiendo el método las etapas de:

5 poner en contacto una muestra que comprende transcritos de la secuencia del ácido nucleico diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

1) una secuencia de bases y longitud comunes;

10 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;

3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

15 composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

20 en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que comprende transcritos de tanto el alelo diana como otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico, los transcritos del alelo particular son suprimidos a un mayor nivel que un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico.

25 En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de una secuencia del ácido nucleico diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos de la misma secuencia del ácido nucleico diana, comprendiendo el método las etapas de:

30 poner en contacto una muestra que comprende transcritos de la secuencia del ácido nucleico diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

35 1) una secuencia de bases y longitud comunes;

2) un patrón común de enlaces del esqueleto;

40 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

45 en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que comprende transcritos de tanto el alelo diana como otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico, los transcritos del alelo particular son suprimidos a un mayor nivel que un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico,

50 siendo la puesta en contacto realizada en condiciones determinadas para permitir que la composición suprima transcritos del alelo particular.

55 En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de una secuencia del ácido nucleico diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos de la misma secuencia del ácido nucleico diana, comprendiendo el método las etapas de:

60 poner en contacto una muestra que comprende transcritos de la secuencia del ácido nucleico diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

65 1) una secuencia de bases y longitud comunes;

2) un patrón común de enlaces del esqueleto;

3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

5 composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

10 en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que comprende transcritos de la misma secuencia del ácido nucleico diana, muestra supresión de transcritos del alelo particular a un nivel que es:

15 a) superior a cuando la composición está ausente;

b) superior a un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico; o

20 c) tanto superior a cuando la composición está ausente como superior a un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico.

25 En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de una secuencia del ácido nucleico diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos de la misma secuencia del ácido nucleico diana, comprendiendo el método las etapas de:

30 poner en contacto una muestra que comprende transcritos de la secuencia del ácido nucleico diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

1) una secuencia de bases y longitud comunes;

2) un patrón común de enlaces del esqueleto;

35 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

40 composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

45 en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que comprende transcritos de la misma secuencia del ácido nucleico diana, muestra supresión de transcritos del alelo particular a un nivel que es:

a) superior a cuando la composición está ausente;

b) superior a un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico; o

50 c) tanto superior a cuando la composición está ausente como superior a un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico,

55 siendo la puesta en contacto realizada en condiciones determinadas para permitir que la composición suprima transcritos del alelo particular.

60 En algunas realizaciones, un transcrito es suprimido por escisión de dicho transcrito. En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos está en un intrón. En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos está en un exón. En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos está parcialmente en un exón y parcialmente en un intrón. En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos comprende una mutación que diferencia un alelo de otros alelos. En algunas realizaciones, una mutación es una delección. En algunas realizaciones, una mutación es una inserción. En algunas realizaciones, una mutación es una mutación puntual. En algunas realizaciones, un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos comprende al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) que diferencia un alelo de otros alelos.

65 En algunas realizaciones, una secuencia del ácido nucleico diana es un gen diana.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un gen cuya secuencia comprende al menos un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP), que comprende proporcionar una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes, en donde la secuencia de bases común es o comprende una secuencia que es completamente complementaria a una secuencia encontrada en un transcrito del primer alelo pero no a la secuencia correspondiente encontrada en un transcrito del segundo alelo, en donde la secuencia encontrada en los transcritos comprende un sitio de SNP;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto;

en donde el transcrito del primer alelo es suprimido al menos cinco veces más que el del segundo alelo.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de un gen diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos del mismo gen diana, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto una muestra que comprende transcritos del gen diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que comprende transcritos de tanto el alelo diana como otro alelo del mismo gen, los transcritos del alelo particular son suprimidos a un nivel al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de un gen diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos del mismo gen diana, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto una muestra que comprende transcritos del gen diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que comprende transcritos de tanto el alelo diana como otro alelo del mismo gen, los transcritos del alelo particular



son suprimidos a un nivel al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen,

5 siendo la puesta en contacto realizada en condiciones determinadas para permitir que la composición suprima transcritos del alelo particular.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de un gen diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos del mismo gen diana, comprendiendo el método las etapas de:

10 poner en contacto una muestra que comprende transcritos del gen diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 15 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 20 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

25 en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que expresa transcritos de tanto el alelo diana como otro alelo del mismo gen, los transcritos del alelo particular son suprimidos a un nivel al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen,

30 siendo la puesta en contacto realizada en condiciones determinadas para permitir que la composición suprima la expresión del alelo particular.

35 En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de un gen diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos del mismo gen diana, comprendiendo el método las etapas de:

40 poner en contacto una muestra que comprende transcritos del gen diana con una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 45 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

50 composición que está quiralmente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

55 en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque cuando se pone en contacto con un sistema que expresa transcritos del gen diana, muestra supresión de la expresión de transcritos del alelo particular a un nivel que es:

- 60 a) al menos 2 veces en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son 2 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente;
- b) al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen; o
- 65 c) tanto al menos 2 veces en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son 2 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente como al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de un gen diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos del mismo gen diana, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto una muestra que comprende transcritos del gen diana con una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmemente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que expresa transcritos del gen diana, muestra supresión de la expresión de transcritos del alelo particular a un nivel que es:

- a) al menos 2 veces en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son 2 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente;
- b) al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen; o
- c) tanto al menos 2 veces en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son 2 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente como al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen,

siendo la puesta en contacto realizada en condiciones determinadas para permitir que la composición suprima transcritos del alelo particular.

En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona un método para la supresión específica de alelo de un transcrito de un gen diana para el que existe una pluralidad de alelos dentro de una población, cada uno de los cuales contiene un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos que define el alelo con respecto a otros alelos del mismo gen diana, comprendiendo el método las etapas de:

poner en contacto una muestra que comprende transcritos del gen diana con una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido particular caracterizados por:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 2) un patrón común de enlaces del esqueleto;
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto;

composición que está quiralmemente controlada que está enriquecida, con respecto a una preparación sustancialmente racémica de oligonucleótidos que tienen la misma secuencia de bases y longitud, en oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular;

en donde la secuencia de bases común para los oligonucleótidos del tipo de oligonucleótido particular es o comprende una secuencia que es complementaria al elemento de secuencia característico que define un alelo particular, caracterizándose la composición porque, cuando se pone en contacto con un sistema que expresa transcritos del gen diana, muestra supresión de la expresión de transcritos del alelo particular a un nivel que es:

- a) al menos 2 veces en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son 2 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente;
- b) al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen; o
- c) tanto al menos 2 veces en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son 2 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente como al menos 2 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo del mismo gen,

siendo la puesta en contacto realizada en condiciones determinadas para permitir que la composición suprima la expresión del alelo particular.

5 En algunas realizaciones, la supresión de transcritos de un alelo particular es a un nivel que es mayor que cuando la composición está ausente. En algunas realizaciones, la supresión de transcritos de un alelo particular es a un nivel que es al menos 1,1 veces con respecto a cuando la composición está ausente, en que los transcritos del alelo particular se detectan en cantidades que son al menos 1,1 veces inferiores cuando la composición está presente con respecto a cuando está ausente. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,2 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,3 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,4 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,5 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,6 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,7 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,8 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,9 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 2 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 3 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 4 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 5 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 6 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 7 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 8 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 9 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 10 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 11 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 12 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 13 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 14 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 15 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 20 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 30 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 40 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 50 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 75 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 100 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 150 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 200 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 300 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 400 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 500 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 750 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1000 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 5000 veces.

30 En algunas realizaciones, la supresión de transcritos de un alelo particular es a un nivel que es mayor que un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico. En algunas realizaciones, la supresión de transcritos de un alelo particular es a un nivel que es al menos 1,1 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,2 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,3 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,4 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,5 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,6 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,7 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,8 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1,9 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 2 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 3 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 4 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 5 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 6 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 7 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 8 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 9 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 10 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 11 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 12 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 13 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 14 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 15 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 20 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 30 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 40 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 50 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 75 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 100 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 150 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 200 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 300 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 400 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 500 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 750 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 1000 veces. En algunas realizaciones, un nivel es al menos 5000 veces.

55 En algunas realizaciones, la supresión de transcritos de un alelo particular es a un nivel que es mayor que cuando la composición está ausente, y a un nivel que es mayor que un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico. En algunas realizaciones, la supresión de transcritos de un alelo particular es a un nivel que es al menos 1,1 veces con respecto a cuando la composición está ausente, y al menos 1,1 veces superior a un nivel de supresión observado para otro alelo de la misma secuencia del ácido nucleico. En algunas realizaciones, cada vez es independientemente como se ha descrito anteriormente.

60 En algunas realizaciones, un sistema es una composición que comprende un transcrito. En algunas realizaciones, un sistema es una composición que comprende transcritos de diferentes alelos. En algunas realizaciones, un sistema puede ser *in vivo* o *in vitro*, y en cualquier forma puede comprender una o más células, tejidos, órganos u organismos. En algunas realizaciones, un sistema comprende una o más células. En algunas realizaciones, un sistema comprende uno o más tejidos. En algunas realizaciones, un sistema comprende uno o más órganos. En algunas realizaciones, un sistema comprende uno o más organismos. En algunas realizaciones, un sistema es un sujeto.

65

5 En algunas realizaciones, la supresión de un transcrito, o la supresión de la expresión de un alelo del que se transcribe un transcrito, se pueden medir en un ensayo *in vitro*. En algunas realizaciones, una secuencia de un transcrito y que comprende un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos se usa en ensayos en lugar del transcrito de longitud completa. En algunas realizaciones, un ensayo es un ensayo bioquímico. En algunas realizaciones, un ensayo es un ensayo bioquímico en donde un polímero de ácido nucleico, por ejemplo, un transcrito o una secuencia de un transcrito y que comprende un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos, se prueba para su escisión por una enzima en presencia de una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados.

10 En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada se administra a un sujeto. En algunas realizaciones, un sujeto es un animal. En algunas realizaciones, un sujeto es una planta. En algunas realizaciones, un sujeto es un ser humano.

15 En algunas realizaciones, para la supresión específica de alelo de transcritos de un alelo particular, los transcritos se escinden en un sitio cerca de una diferencia de secuencia, por ejemplo una mutación, dentro de un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos, diferencia de secuencia que diferencia transcritos de un alelo particular de transcritos de los otros alelos. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden selectivamente en un sitio cerca de dicha diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden a un mayor porcentaje en un sitio cerca de dicha diferencia de secuencia que cuando se usa una composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en el sitio de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden solo en el sitio de una diferencia de secuencia dentro de un elemento de secuencia característico de nucleótidos específicos. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 5 pares de bases en la dirección 3' o en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 4 pares de bases en la dirección 3' o en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 3 pares de bases en la dirección 3' o en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 2 pares de bases en la dirección 3' o en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 1 par de bases en la dirección 3' o en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 5 pares de bases en la dirección 3' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 4 pares de bases en la dirección 3' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 3 pares de bases en la dirección 3' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 2 pares de bases en la dirección 3' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 1 par de bases en la dirección 3' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 5 pares de bases en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 4 pares de bases en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 3 pares de bases en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 2 pares de bases en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. En algunas realizaciones, los transcritos se escinden en un sitio dentro de 1 par de bases en la dirección 5' de una diferencia de secuencia. Dicho control preciso de patrones de escisión, y la supresión altamente selectiva resultante de transcritos de un alelo particular, no sería posible sin composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y métodos de los mismos proporcionados por el solicitante en la presente divulgación.

45 En el contexto de la presente invención, la presente divulgación también proporciona métodos de tratamiento de un sujeto, o prevención de una enfermedad en un sujeto, suprimiendo específicamente transcritos de un alelo particular, por ejemplo, un alelo que causa o puede causar una enfermedad. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, en donde se suprimen selectivamente los transcritos de un alelo que provoca o contribuye a la enfermedad. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, en donde se suprimen selectivamente los transcritos de un alelo que provoca la enfermedad. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, en donde se suprimen selectivamente los transcritos de un alelo que contribuye a la enfermedad. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad, que comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, en donde se suprimen selectivamente los transcritos de un alelo que está relacionado con la enfermedad. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir una enfermedad en un sujeto, suprimiendo específicamente los transcritos de un alelo particular que puede provocar una enfermedad. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona métodos para prevenir una enfermedad en un sujeto, suprimiendo específicamente los transcritos de un alelo particular que aumenta el riesgo de una enfermedad en el sujeto. En algunas realizaciones, un método proporcionado comprende administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una

composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéutico.

- 5 Las enfermedades que implican a alelos causantes de enfermedad son ampliamente conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, aquellos descritos en Hohjoh, Pharmaceuticals 2013, 6, 522-535; publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2013/0197061; Østergaard et al., Nucleic Acids Research 2013, 41(21), 9634-9650; y Jiang et al., Science 2013, 342, 111-114. En algunas realizaciones, una enfermedad es la enfermedad de Huntington. En algunas realizaciones, una enfermedad es cardiomiopatía hipertrófica humana (HCM). En algunas realizaciones, una enfermedad es cardiomiopatía dilatada. En algunas realizaciones, un alelo causante de enfermedad es un alelo de cadenas pesadas de miosina (MHC). En algunas realizaciones, una enfermedad a modo de ejemplo se selecciona de:
- 10

Enfermedad	Gen diana	Variación diana	Enfermedad	Gen diana	Variación diana
Enfermedad de Alzheimer familiar	Proteína precursora amiloidea (APP)	K670N-M671L (mutante sueco)	Demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17 (FTDP-17)	Proteína TAU asociada a los microtúbulos (MAPT)	V337M
	Proteína precursora amiloidea (APP)	K670N-M671L (mutante sueco)			
	Proteína precursora amiloidea (APP)	V717F (mutante de Londres)	Síndrome de Ehlers-Danlos (vEDS)	Procolágeno tipo III (COL3A1)	G252V
	Proteína precursora amiloidea (APP)	V717I (mutante de Londres)	Anemia de células falciformes	Locus de hemoglobina-beta (HBB)	E6V
	Presenilina 1 (PSEN1)	L392V	Polineuropatía amiloide familiar (FAP)	Transtiretina (TTR)	V30M
	Superóxido dismutasa (SOD1)	G93A			
	Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	Superóxido dismutasa (SOD1)	G93A	Fibrodisplasia osificante progresiva (FOP)	Receptor de activina A de tipo I (ACVR1)
Superóxido dismutasa (SOD1)		G85R	Tumores	Receptor de activina A de tipo I (ACVR1)	R206H
Síndrome miasténico congénito de canal lento (SCCMS)	Receptor de acetilcolina (AChR)	aS226F	Ataxia espinocerebelosa de tipo 1 (SCA1)	Ataxina-1 (ATXN1)	Región flanqueante de repetición CAG expandida

## ES 2 917 473 T3

Enfermedad	Gen diana	Variación diana
Enfermedad de Machado-Joseph/ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (MJD/SCA3)	ATAXINA3/MJD1	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Ataxia espinocerebelosa de tipo 7 (SCA7)	Ataxina-7(ATXN7)	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Enfermedad de Parkinson	Cinasa 2 de repeticiones ricas en leucina (LRRK2)	R1441G, R1441C
	Cinasa 2 de repeticiones ricas en leucina (LRRK2)	G20195S
	Alfa-sinucleína	A30P
Enfermedad de Huntington	Huntingtina (HTT)	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Cardiomiopatía hipertrófica	MYH7	R403Q

Las dianas a modo de ejemplo de, y las enfermedades que se pueden tratar por, las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionadas y métodos, comprenden:

Enfermedad	Gen diana	Variación diana
Enfermedad de Alzheimer familiar	Proteína precursora amiloidea (APP)	K670N-M671L (mutante sueco)
	Proteína precursora amiloidea (APP)	K670N-M671L (mutante sueco)
	Proteína precursora amiloidea (APP)	V717F (mutante de Londres)
	Proteína precursora amiloidea (APP)	V717I (mutante de Londres)
	Presenilina 1 (PSEN1)	L392V
Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	Superóxido dismutasa (SOD1)	G93A
	Superóxido dismutasa (SOD1)	G85R
Síndrome miasténico congénito de canal lento (SCCMS)	Receptor de acetilcolina (AChR)	aS226F, aT254I, aS269I
Demencia frontotemporal con parkinsonismo asociado al cromosoma 17 (FTDP-17)	Proteína TAU asociada a los microtúbulos (MAPT)	V337M
Síndrome de Ehlers-Danlos (vEDS)	Procolágeno de tipo III (COL3A1)	G252V
Anemia de células falciformes	Locus de hemoglobina-beta (HBB)	E6V
Polineuropatía amiloide familiar (FAP)	Transtiretina (TTR)	V30M
Fibrodisplasia osificante progresiva (FOP)	Receptor de activina A de tipo I (ACVR1)	R206H, G356D
	Receptor de activina A de tipo I (ACVR1)	R206H
Tumores	KRAS	G12V, G12D, G13D
Tumores	Fosfoinositida-3-cinasa, catalítica, polipéptido alfa (PIK3CA)	G1633A, A3140G
Ataxia espinocerebelosa de tipo 1 (SCA1)	Ataxina-1 (ATXN1)	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Ataxia espinocerebelosa de tipo 7 (SCA7)	Ataxina-7 (ATXN7)	SNP asociados a la repetición de CAG expandida

## ES 2 917 473 T3

Enfermedad	Gen diana	Variación diana
Ataxia espinocerebelosa de tipo 3 (SCA3) / enfermedad de Machado-Joseph	Ataxina-3 (ATXN3)	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Enfermedad de Parkinson	Cinasa 2 de repeticiones ricas en leucina (LRRK2)	R1441G, R1441C
	Cinasa 2 de repeticiones ricas en leucina (LRRK2)	G20195S
	Alfa-sinucleína (SNCA)	A30P, A53T, E46K
Enfermedad de Huntington	Huntingtina (HTT)	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Enfermedad de Huntington-similar a 2	JPH3	SNP asociados a la repetición de CTG expandida
Ataxia de Friedreich	FXN	SNP asociados a la repetición de GAA expandida
Síndrome de retraso mental de X frágil / síndrome de temblor y ataxia de X frágil	FMR1	SNP asociados a la repetición de CGG expandida
Distrofia miotónica (DM1)	DMPK	SNP asociados a la repetición de CTG expandida
Distrofia miotónica (DM2)	ZNF9	SNP asociados a la repetición de CTG expandida
Atrofia muscular espinobulbar	AR	SNP asociados a la repetición de CAG expandida
Cardiomiopatía hipertrófica	MHY7	R403Q

En algunas realizaciones, un sitio de huntingtina diana se selecciona de rs9993542\_C, rs362310\_C, rs362303\_C, rs10488840\_G, rs363125\_C, rs363072\_A, rs7694687\_C, rs363064\_C, rs363099\_C, rs363088\_A, rs34315806\_C, rs2298967\_T, rs362272\_G, rs362275\_C, rs362306\_G, rs3775061\_A, rs1006798\_A, rs16843804\_C, rs3121419\_C, rs362271\_G, rs362273\_A, rs7659144\_C, rs3129322\_T, rs3121417\_G, rs3095074\_G, rs362296\_C, rs108850\_C, rs2024115\_A, rs916171\_C, rs7685686\_A, rs6844859\_T, rs4690073\_G, rs2285086\_A, rs362331\_T, rs363092\_C, rs3856973\_G, rs4690072\_T, rs7691627\_G, rs2298969\_A, rs2857936\_C, rs6446723\_T, rs762855\_A, rs1263309\_T, rs2798296\_G, rs363096\_T, rs10015979\_G, rs11731237\_T, rs363080\_C, rs2798235\_G y rs362307\_T. En algunas realizaciones, un sitio de huntingtina diana se selecciona de rs34315806\_C, rs362273\_A, rs362331\_T, rs363099\_C, rs7685686\_A, rs362306\_G, rs363064\_C, rs363075\_G, rs2276881\_G, rs362271\_G, rs362303\_C, rs362322\_A, rs363088\_A, rs6844859\_T, rs3025838\_C, rs363081\_G, rs3025849\_A, rs3121419\_C, rs2298967\_T, rs2298969\_A, rs16843804\_C, rs4690072\_T, rs362310\_C, rs3856973\_G, y rs2285086\_A. En algunas realizaciones, un sitio de huntingtina diana se selecciona de rs362331\_T, rs7685686\_A, rs6844859\_T, rs2298969\_A, rs4690072\_T, rs2024115\_A, rs3856973\_G, rs2285086\_A, rs363092\_C, rs7691627\_G, rs10015979\_G, rs916171\_C, rs6446723\_T, rs11731237\_T, rs362272\_G, rs4690073\_G, y rs363096\_T. En algunas realizaciones, un sitio de huntingtina diana se selecciona de rs362267, rs6844859, rs1065746, rs7685686, rs362331, rs2024115, rs362275, rs362273, rs362272, rs3025805, rs3025806, rs35892913, rs363125, rs17781557, rs4690072, rs4690074, rs1557210, rs363088, rs362268, rs362308, rs362307, rs362306, rs362305, rs362304, rs362303, rs362302, rs363075 y rs2298969. En algunas realizaciones, un sitio de huntingtina diana se selecciona de:

ES 2 917 473 T3

Frecuencia de heterocigosidad para 24 sitios de SNP en el ARNm de huntingtina			
Localización en el ARNm (Posición, nt)	Número de referencia	Porcentaje de heterocigosidad	
		Controles	Pacientes con HD
ORF, exón 20 (2822)	rs363075	G/A, 10,3 % (G/G, 89,7 %)	G/A, 12,8 % (G/G, 86,2 %; A/A, 0,9 %)
ORF, exón 25 (3335)	rs35892913	G/A, 10,3 % (G/G, 89,7 %)	G/A, 13,0 % (G/G, 86,1 %; A/A, 0,9 %)
ORF, exón 25 (3389)	rs1065746	G/C, 0 % (G/G, 100 %)	G/C, 0,9 % (G/G, 99,1 %)
ORF, exón 25 (3418)	rs17781557	T/G, 12,9 % (T/T, 87,1 %)	T/G, 1,9 % (T/T, 98,1 %)
ORF, exón 29 (3946)	rs4690074	C/T, 37,9 % (C/C, 50,9 %; T/T, 11,2)	C/T, 35,8 % (C/C, 59,6 %; T/T, 4,6 %)
ORF, exón 39 (5304)	rs363125	C/A, 17,5 % (C/C, 79,0 %; A/A, 3,5 %)	C/A, 11,0 % (C/C, 87,2 %; A/A, 1,8 %)
ORF, exón 44 (6150)	exón 44	G/A, 0 % (G/G, 100 %)	G/A, 2,8 % (G/G, 97,2 %)
ORF, exón 48 (6736)	rs362336	G/A, 38,7 % (G/G, 49,6 %; A/A, 11,7 %)	G/A, 37,4 % (G/G, 57,9 %; A/A, 4,7 %)
ORF, exón 50 (7070)	rs362331	T/C, 45,7 % (T/T, 31,0 %; C/C, 23,3 %)	T/C, 39,4 % (T/T, 49,5 %; C/C, 11,0 %)
ORF, exón 57 (7942)	rs362273	A/G, 40,3 % (A/A, 48,2 %; G/G, 11,4 %)	A/G, 35,2 % (A/A, 60,2 %; G/G, 4,6 %)
ORF, exón 61 (8501)	rs362272	G/A, 37,1 % (G/G, 51,7 %; A/A, 11,2 %)	G/A, 36,1 % (G/G, 59,3 %; A/A, 4,6 %)
ORF, exón 65 (9053)	rs3025806	A/T, 0 % (C/C, 100 %)	A/T, 0 % (C/C, 100 %)
ORF, exón 65 (9175)	exón 65	G/A, 2,3 % (G/G, 97,7 %)	G/A, 0 % (G/G, 100 %)
ORF, exón 67 (9523)	rs362308	T/C, 0 % (T/T, 100 %)	T/C, 0 % (T/T, 100 %)
3'UTR, exón 67 (9633)	rs362307	C/T, 13,0 % (C/C, 87,0 %)	C/T, 48,6 % (C/C, 49,5 %; T/T, 1,9 %)
3'UTR, exón 67 (9888)	rs362306	G/A, 36,0 % (G/G, 52,6 %; A/A, 11,4 %)	G/A, 35,8 % (G/G, 59,6 %; A/A, 4,6 %)
3'UTR, exón 67 (9936)	rs362268	C/G, 36,8 % (C/C, 50,0 %; G/G 13,2 %)	C/G, 35,8 % (C/C, 59,6 %; G/G, 4,6 %)
3'UTR, exón 67 (9948)	rs362305	C/G, 20,2 % (C/C, 78,1 %; G/G 1,8 %)	C/G, 11,9 % (C/C, 85,3 %; G/G, 2,8 %)
3'UTR, exón 67 (10060)	rs362304	C/A, 22,8 % (C/C, 73,7 %; A/A, 3,5 %)	C/A, 11,9 % (C/C, 85,3 %; AA, 2,8 %)
3'UTR, exón 67 (10095)	rs362303	C/T, 18,4 % (C/C, 79,8 %; T/T, 1,8 %)	C/A, 11,9 % (C/C, 85,3 %; T/T, 2,8 %)
3'UTR, exón 67 (10704)	rs1557210	C/T, 0 % (C/C, 100 %)	C/T, 0 % (C/C, 100 %)
3'UTR, exón 67 (10708)	rs362302	C/T, 4,3 % (C/C, 95,7 %)	C/T, 0 % (C/C, 100 %)
3'UTR, exón 67 (10796)	rs3025805	G/T, 0 % (G/G, 100 %)	G/T, 0 % (G/G, 100 %)
3'UTR, exón 67 (11006)	rs362267	C/T, 36,2 % (C/C, 52,6 %; T/T, 11,2 %)	C/T, 35,5 % (C/C, 59,8 %; T/T, 4,7 %)

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados se dirige a dos o más sitios. En algunas realizaciones, los dos o más sitios elegidos se seleccionan de los sitios enumerados en el presente documento.

5 Un experto habitual en la técnica entiende que los métodos proporcionados se aplican a cualquier diana similar que contenga un desapareamiento. En algunas realizaciones, un desapareamiento es entre un gen materno y uno paterno.



Las dianas adicionales a modo de ejemplo para la supresión y/o atenuación, que incluyen la supresión específica de alelo y/o la atenuación, pueden ser cualquier anomalía genética, por ejemplo, mutaciones, relacionadas con cualquier enfermedad. En algunas realizaciones, se selecciona una diana, o un conjunto de dianas, de determinantes genéticos de enfermedades, por ejemplo, como se desvela en Xiong, et al., The human splicing code reveals new insights into the genetic determinants of disease. Science Vol. 347 no. 6218 DOI: 10.1126/science.1254806. En algunas realizaciones, un desapareamiento es entre un mutante y un natural.

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y los métodos proporcionados se usan para suprimir selectivamente oligonucleótidos con una mutación en una enfermedad. En algunas realizaciones, una enfermedad es cáncer. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y los métodos proporcionados se usan para suprimir selectivamente transcritos con mutaciones en cáncer. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y los métodos proporcionados se usan para suprimir transcritos de KRAS. Los sitios KRAS diana a modo de ejemplo target comprenden G12V = GGU -> GUU Posición 227 G->U, G12D = GGU->GAU Posición 227 G->A y G13D = GGC -> GAC Posición 230 G->A.

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas y los métodos proporcionan la supresión específica de alelo de un transcrito en un organismo. En algunas realizaciones, un organismo comprende un gen diana para el que existen dos o más alelos. Por ejemplo, un sujeto tiene un gen natural en sus tejidos normales, mientras que el mismo gen se muta en tejidos enfermos, tales como en un tumor. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y métodos que suprimen selectivamente un alelo, por ejemplo, uno con una mutación o SNP. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona tratamiento con mayor eficacia y/o baja toxicidad, y/u otros beneficios como se describe en la solicitud.

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas comprenden oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas comprenden oligonucleótidos de solo un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas tienen oligonucleótidos de solo un tipo de oligonucleótido. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas comprenden oligonucleótidos de dos o más tipos de oligonucleótidos. En algunas realizaciones, usando dichas composiciones, los métodos proporcionados pueden dirigirse a más de una diana. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende dos o más tipos de oligonucleótidos se dirige a dos o más dianas. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende dos o más tipos de oligonucleótidos se dirige a dos o más desapareamientos. En algunas realizaciones, un único tipo de oligonucleótido se dirige a dos o más dianas, por ejemplo, mutaciones. En algunas realizaciones, una región diana de oligonucleótidos de un tipo de oligonucleótido comprende dos o más "sitios diana", tal como dos mutaciones o SNP.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada comprenden opcionalmente bases o azúcares modificados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada no tiene bases o azúcares modificados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada no tiene bases modificadas. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada comprenden bases y azúcares modificados. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada comprenden una base modificada. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada comprenden un azúcar modificado. Las bases y azúcares modificados para oligonucleótidos son ampliamente conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limita a aquellos descritos en la presente divulgación. En algunas realizaciones, una base modificada es 5-mC. En algunas realizaciones, un azúcar modificado es un azúcar modificado en 2'. La modificación en 2' adecuada de azúcares de oligonucleótido es ampliamente conocida por un experto habitual en la técnica. En algunas realizaciones, las modificaciones en 2' incluyen pero no se limitan a 2'-OR<sup>1</sup>, en donde R<sup>1</sup> no es hidrógeno. En algunas realizaciones, una modificación en 2' es 2'-OR<sup>1</sup>, en donde R<sup>1</sup> es alifático C<sub>1-6</sub> opcionalmente sustituido. En algunas realizaciones, una modificación en 2' es 2'-MOE. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-halógeno. En algunas realizaciones, una modificación es 2'-F. En algunas realizaciones, las bases o azúcares modificados pueden además potenciar la actividad, estabilidad y/o selectividad de una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados, cuyo patrón común de centros quirales del esqueleto proporciona actividad, estabilidad y/o selectividad inesperada.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada no tiene azúcares modificados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada no tiene azúcares modificados en 2'. En algunas realizaciones, la presente invención encontró sorprendentemente que mediante el uso de composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados, los azúcares modificados no se necesitan para la estabilidad, actividad y/o el control de patrones de escisión. Además, en algunas realizaciones, la presente invención encontró sorprendentemente que las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados de oligonucleótidos sin azúcares modificados suministran mejores propiedades en términos

de estabilidad, actividad, renovación y/o control de patrones de escisión. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se encontró sorprendentemente que las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados de oligonucleótidos que no tienen azúcares modificados se disocian mucho más rápido de los productos de escisión y proporcionan una renovación significativamente más alta que las composiciones de oligonucleótidos con azúcares modificados.

5 Los oligonucleótidos de las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionadas útiles para los métodos proporcionados desvelados en el presente documento tienen estructuras como se describen ampliamente descritas en la presente divulgación. En algunas realizaciones, un oligonucleótido tiene una estructura de ala-núcleo-ala como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_mRp$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_2Rp$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_m(Rp)_n$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Rp)_n(Sp)_m$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $Rp(Sp)_m$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_m(Rp)_n(Sp)_t$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_mRp(Sp)_t$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_t(Rp)_n(Sp)_m$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_tRp(Sp)_m$  como se describe. En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $SpRpSpSp$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_2Rp(Sp)_2$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_3Rp(Sp)_3$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_4Rp(Sp)_4$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_tRp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $SpRp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_2Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_3Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_4Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones, el patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende  $(Sp)_5Rp(Sp)_5$ . En algunas realizaciones, un patrón común de centros quirales del esqueleto solo tiene un Rp, y cada uno de los otros enlaces internucleotídicos es Sp. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 35, 40, 45 o 50 como se describe en la presente divulgación. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 10. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 11. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 12. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 13. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 14. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 15. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 16. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 17. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 18. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 19. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 20. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 21. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 22. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 23. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 24. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 25. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 26. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 27. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 28. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 29. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 30. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 31. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 32. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 33. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 34. En algunas realizaciones, una longitud de bases común es mayor que 35.

65

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada proporciona mayor renovación. En algunas realizaciones, los productos de escisión de un polímero de ácido nucleico se disocian de oligonucleótidos de una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada a una tasa más rápida que de oligonucleótidos de una composición de oligonucleótidos de referencia, por ejemplo, una composición de oligonucleótidos quiralmemente no controlados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionada se pueden administrar en menor dosis unitaria, y/o dosis total, y/o menos dosis que la composición de oligonucleótidos quiralmemente no controlados.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporciona menos sitios de escisión en la secuencia de un polímero de ácido nucleico que es complementaria a su secuencia de bases común o una secuencia dentro de su secuencia de bases común cuando se compara con una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporciona menos sitios de escisión en la secuencia de un polímero de ácido nucleico que es complementaria a su secuencia de bases común. En algunas realizaciones, un polímero de ácido nucleico se escinde selectivamente en un único sitio dentro de la secuencia que es complementaria a la secuencia de bases común, o una secuencia dentro de la secuencia de bases común, de una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporciona mayor porcentaje de escisión en un sitio de escisión dentro de la secuencia que es complementaria a la secuencia de bases común, o una secuencia dentro de la secuencia de bases común, de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporciona mayor porcentaje de escisión en un sitio de escisión dentro de la secuencia que es complementaria a la secuencia de bases común de la composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados. En algunas realizaciones, un sitio que tiene un mayor porcentaje de escisión es un sitio de escisión cuando se usa una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, un sitio que tiene mayor porcentaje de escisión es un sitio de escisión que no está presente cuando se usa una composición de oligonucleótidos de referencia.

Se encuentra sorprendentemente que con el número reducido de sitios de escisión en la secuencia complementaria, la tasa de escisión puede ser inesperadamente elevada y/o se puede lograr mayor porcentaje de escisión. Como se demuestra en los ejemplos de la presente divulgación, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas que producen menos sitios de escisión, especialmente las que proporcionan la escisión de un único sitio, dentro de las secuencias complementarias de polímero de ácido nucleico diana proporcionan tasas de escisión mucho mayores y niveles mucho menores de polímeros de ácido nucleico no escindidos restantes. Dichos resultados son en claro contraste con las enseñanzas generales en la técnica en las que se han perseguido más sitios de escisión para aumentar la tasa de escisión.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados aumenta la tasa de escisión por 1,5 veces en comparación con una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 2 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 3 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 4 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 5 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 6 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 7 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 8 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 9 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 10 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 11 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 12 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 13 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 14 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 15 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 20 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 30 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 40 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 50 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 60 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 70 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 80 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 90 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 100 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 200 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 300 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 400 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos 500 veces. En algunas realizaciones, la tasa de escisión aumenta en al menos más de 500 veces.

En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporciona un menor nivel de polímero de ácido nucleico diana no escindido restante en comparación con una composición de oligonucleótidos de referencia. En algunas realizaciones, es 1,5 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 2 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 3 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 4 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 5 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 6 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 7 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 8 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 9 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 10 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 11 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 12 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 13 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 14 veces inferior. En algunas

realizaciones, es al menos 15 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 20 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 30 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 40 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 50 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 60 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 70 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 80 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 90 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 100 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 200 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 300 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 400 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 500 veces inferior. En algunas realizaciones, es al menos 1000 veces inferior.

Como se trata con detalle en el presente documento, la presente invención proporciona, entre otras cosas, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados, que significa que la composición contiene una pluralidad de oligonucleótidos de al menos un tipo. Cada molécula de oligonucleótido de un "tipo" particular comprende elementos estructurales preseleccionados (por ejemplo, predeterminados) con respecto a: (1) secuencia de bases; (2) patrón de enlaces del esqueleto; (3) patrón de centros quirales del esqueleto; y (4) patrón de restos de modificación en P del esqueleto. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos proporcionados contienen oligonucleótidos que se preparan en un único proceso de síntesis. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas contienen oligonucleótidos que tienen más de una configuración quiral dentro de una única molécula de oligonucleótido (por ejemplo, donde diferentes restos a lo largo del oligonucleótido tienen diferente estereoquímica); en algunas de dichas realizaciones, dichos oligonucleótidos se pueden obtener en un único proceso de síntesis, sin la necesidad de etapas de conjugación secundaria para generar moléculas de oligonucleótidos individuales con más de una configuración quiral.

Las composiciones de oligonucleótidos como se proporcionan en el presente documento se pueden usar como agentes para modular varios procesos celulares y maquinarias, que incluyen, pero no se limitan a, transcripción, traducción, respuestas inmunitarias, epigenética, etc. Además, las composiciones de oligonucleótidos como se proporcionan en el presente documento se pueden usar como reactivos para fines de investigación y/o de diagnóstico. Un experto habitual en la técnica reconocerá fácilmente que la presente invención divulgada en el presente documento no se limita a un uso particular, sino que es aplicable a cualquier situación donde se desea el uso de oligonucleótidos sintéticos. Entre otras cosas, las composiciones proporcionadas son útiles en una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, agrícolas y/o de investigación.

En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos proporcionadas comprenden oligonucleótidos y/o restos de los mismos que incluyen una o más modificaciones estructurales como se describe en detalle en el presente documento. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos proporcionadas comprenden oligonucleótidos que contienen uno o más análogos de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos proporcionadas comprenden oligonucleótidos que contienen uno o más ácidos nucleicos o restos artificiales, que incluyen, pero no se limitan a: ácidos nucleicos peptídicos (PNA), morfolino y ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos de glicól (GNA), ácidos nucleicos treósicos (TNA), ácidos xenonucleicos (ZNA), y cualquier combinación de los mismos.

En cualquiera de las realizaciones, la invención es útil para la modulación de la expresión génica basada en oligonucleótidos, respuesta inmunitaria, etc. Por consiguiente, las composiciones de oligonucleótidos estereo-definidas de la invención, que contienen oligonucleótidos de tipo predeterminado (es decir, que están controladas quiralmente, y son opcionalmente quiralmente puras), se pueden usar en lugar de los homólogos estereoaleatorios o quiralmente impuros convencionales. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas muestran efectos previstos potenciados y/o efectos secundarios reducidos no deseados. Ciertas realizaciones de aplicaciones biológicas y clínicas/ terapéuticas de la invención se tratan explícitamente a continuación.

Se pueden utilizar diversas pautas posológicas para administrar las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionadas. En el presente documento se desvelan en el contexto de la invención que en algunas realizaciones se administran múltiples dosis unitarias, separadas por periodos de tiempo. En algunas realizaciones, una composición dada tiene una pauta posológica recomendada, que puede implicar a una o más dosis. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis cada una separada por un periodo de tiempo de la misma longitud; en algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una pluralidad de dosis y al menos dos periodos de tiempo diferentes que separan las dosis individuales. En algunas realizaciones, todas las dosis dentro de una pauta posológica son de la misma cantidad de dosis unitaria. En algunas realizaciones, diferentes dosis dentro de una pauta posológica son de diferentes cantidades. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguido por uno o más dosis adicionales en una segunda cantidad de dosis diferente de la primera cantidad de dosis. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende una primera dosis en una primera cantidad de dosis, seguida por una o más dosis adicionales en una segunda (o posterior) cantidad de dosis que es la misma que o diferente de la primera cantidad de dosis (u otra dosis previa). En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar al menos una dosis unitaria durante al menos un día. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar más de una dosis durante un periodo de tiempo de al menos un día, y algunas veces más de un día. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar dosis múltiples durante un periodo de tiempo de al menos una semana. En algunas realizaciones, el periodo de tiempo es al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27,

28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más (por ejemplo, aproximadamente 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más) semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por semana durante más de una semana. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por semana durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más (por ejemplo, aproximadamente 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más) semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis cada dos semanas durante un periodo de más de dos semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis cada dos semanas durante un periodo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 o más (p. ej., aproximadamente 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 o más) semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por mes durante un mes. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por mes durante más de un mes. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por mes durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más meses. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por semana durante aproximadamente 10 semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por semana durante aproximadamente 20 semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por semana durante aproximadamente 30 semanas. En algunas realizaciones, una pauta posológica comprende administrar una dosis por semana durante 26 semanas. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados se administra según una pauta posológica que se diferencia de la utilizada para una composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados (por ejemplo, estereoealeatorios) de la misma secuencia, y/o de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados diferente de la misma secuencia. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados se administra según una pauta posológica que se reduce en comparación con la de una composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados (por ejemplo, estereoealeatorios) de la misma secuencia en la que se logra un menor nivel de exposición total con respecto a una unidad de tiempo dada, implica uno o más dosis unitarias menores y/o incluye un número más pequeño de dosis durante una unidad de tiempo dada. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados se administra según una pauta posológica que se extiende durante un periodo de tiempo más largo que el de una composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados (por ejemplo, estereoealeatorios) de la misma secuencia. Sin desear quedar limitado por teoría, el solicitante observa que en algunas realizaciones, la pauta posológica más corta, y/o los periodos de tiempo más largos entre dosis, pueden ser debidos a estabilidad mejorada, biodisponibilidad y/o eficacia de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados tiene una pauta posológica más larga en comparación con la composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados correspondiente. En algunas realizaciones, una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados tiene un periodo de tiempo más corto entre al menos dos dosis en comparación con la composición de oligonucleótidos quiralmente no controlados correspondiente. Sin desear quedar limitado por teoría, el solicitante observa que en algunas realizaciones una pauta posológica más larga, y/o periodos de tiempo más cortos entre dosis, pueden ser debidos a la seguridad mejorada de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados.

Una dosis única puede contener diversas cantidades de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado, como se desee adecuado por la solicitud. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300 o más (por ejemplo, aproximadamente 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o más) mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 1 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 5 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 10 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 15 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 20 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 50 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 100 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 150 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 200 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 250 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, una dosis única contiene aproximadamente 300 mg de un tipo de oligonucleótido quiralmente controlado. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se administra en una cantidad menor en una dosis única, y/o en dosis total, que un oligonucleótido quiralmente no controlado. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se administra en una cantidad menor en una dosis única, y/o en dosis total, que un oligonucleótido quiralmente no controlado debido a eficacia mejorada. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se administra en una cantidad más alta en una dosis única, y/o en dosis total, que un oligonucleótido quiralmente no controlado. En algunas realizaciones, un oligonucleótido quiralmente controlado se administra en una cantidad más alta en una dosis única, y/o en dosis total, que un oligonucleótido quiralmente no controlado debido a seguridad mejorada.

**Oligonucleótidos biológicamente activos**

Una composición de oligonucleótidos proporcionada como se usa en el presente documento puede comprender oligonucleótidos monocatenarios y/o multicatenarios. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos monocatenarios contienen porciones autocomplementarias que se pueden hibridar en condiciones relevantes de manera que, como se usa, incluso oligonucleótidos monocatenarios puedan tener carácter al menos parcialmente bicatenario. En algunas realizaciones, un oligonucleótido incluido en una composición proporcionada es monocatenario, bicatenario o tricatenario. En algunas realizaciones, un oligonucleótido incluido en una composición proporcionada comprende una porción monocatenaria y una porción multicatenaria dentro del oligonucleótido. En algunas realizaciones, como se observa anteriormente, los oligonucleótidos monocatenarios individuales pueden tener regiones bicatenarias y regiones monocatenarias.

En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas incluyen uno o más oligonucleótidos completamente o parcialmente complementarios a la cadena de: genes estructurales, regiones de control y/o terminación de genes, y/o sistemas autorreplicantes, tales como ADN vírico o de plásmido. En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas incluyen uno o más oligonucleótidos que son o actúan de ARNip u otros reactivos de interferencia por ARN (agentes de iARN o agentes de ARNi), ARNhp, oligonucleótidos antisentido, ARN autoescisores, ribozimas, fragmento de los mismos y/o variantes de los mismos (tales como ARNr 23S de peptidil transferasa, RNasa P, intrones de grupo I y grupo II, ribozimas de ramificación G1R1, Leadzyme, ribozimas de horquilla, ribozimas en cabeza de martillo, ribozimas HDV, ribozima CPEB3 de mamífero, ribozimas VS, ribozimas glmS, ribozima CoTC, etc.), microARN, miméticos de microARN, supermir, aptámeros, antimir, antagonir, adaptadores de UI, oligonucleótidos formadores de triplex, activadores de ARN, ARN largos no codificantes, ARN cortos no codificantes (por ejemplo, ARNpi), oligonucleótidos inmunomoduladores (tales como oligonucleótidos inmunoestimulantes, oligonucleótidos inmunoinhibidores), GNA, LNA, ENA, PNA, TNA, morfolinós, G-quadruplex (ARN y ADN), oligonucleótidos antivíricos y oligonucleótidos señuelo.

En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas incluyen uno o más oligonucleótidos híbridos (por ejemplo, quiméricos). En el contexto de la presente divulgación, el término "híbrido" se refiere ampliamente a componentes estructurales mixtos de oligonucleótidos. Oligonucleótidos híbridos puede referirse a, por ejemplo, (1) una molécula de oligonucleótido que tiene clases mixtas de nucleótidos, por ejemplo, parte ADN y parte ARN dentro de la única molécula (por ejemplo, ADN-ARN); (2) pares complementarios de ácidos nucleicos de diferentes clases, de forma que el apareamiento de bases de ADN:ARN ocurra o intramolecularmente o intermolecularmente; o ambos; (3) un oligonucleótido con dos o más tipos de enlaces del esqueleto o internucleotídicos.

En algunas realizaciones, las composiciones proporcionadas incluyen uno o más oligonucleótidos que comprenden más de una clase de restos de ácido nucleico dentro de una única molécula. Por ejemplo, en cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, un oligonucleótido puede comprender una porción de ADN y una porción de ARN. En algunas realizaciones, un oligonucleótido puede comprender una porción sin modificar y una porción modificada.

Las composiciones de oligonucleótidos proporcionadas pueden incluir oligonucleótidos que contienen cualquiera de una variedad de modificaciones, por ejemplo como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, las modificaciones particulares se seleccionan, por ejemplo, en vista del uso previsto. En algunas realizaciones, es conveniente modificar una o ambas cadenas de un oligonucleótido bicatenario (o una porción bicatenaria de un oligonucleótido monocatenario). En algunas realizaciones, las dos cadenas (o porciones) incluyen diferentes modificaciones. En algunas realizaciones, las dos cadenas incluyen las mismas modificaciones. Un experto en la técnica apreciará que el grado y el tipo de modificaciones habilitadas por los métodos de la presente invención permiten hacer numerosas permutaciones de modificaciones. Dichas modificaciones a modo de ejemplo se describen en el presente documento y no pretenden ser limitantes.

La expresión "cadena no codificante", como se usa en el presente documento, se refiere a un oligonucleótido que es sustancialmente o 100 % complementario a una secuencia diana de interés. La expresión "cadena no codificante" incluye la región antisentido de tanto oligonucleótidos que se forman a partir de dos cadenas separadas, así como oligonucleótidos unimoleculares que son capaces de formar estructuras de tipo horquilla o mancuerna. Los términos "cadena no codificante" y "cadena guía" se usan indistintamente en el presente documento.

La expresión "cadena codificante" se refiere a un oligonucleótido que tiene la misma secuencia de nucleósidos, por completo o en parte, que una secuencia diana, tal como un ARN mensajero o una secuencia de ADN. Los términos "cadena codificante" y "cadena pasajera" se usan indistintamente en el presente documento.

Por "secuencia diana" se indica cualquier secuencia del ácido nucleico cuya expresión o actividad se va a modular. El ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN, tal como ADN o ARN endógeno, ADN vírico o ARN vírico, u otro ARN codificado por un gen, virus, bacteria, hongo, mamífero o planta. En algunas realizaciones, una secuencia diana está asociada con una enfermedad o trastorno.

Por "específicamente hibridable" y "complementario" se indica que un ácido nucleico puede formar enlace(s) de hidrógeno con otra secuencia del ácido nucleico por o Watson-Crick tradicional u otros tipos no tradicionales. En referencia a las moléculas nucleicas de la presente invención, la energía libre de unión para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que avance la función relevante del ácido nucleico, por ejemplo, actividad de iARN. La determinación de las energías libres de unión para moléculas de ácidos nucleicos se conoce bien en la técnica (véase, por ejemplo, Turner et al., 1987, CSH Symp. Quant. Biol. LIT pp.123-133; Frier et al., 1986, Proc. Nat. Acad. Sci. USA83:9373-9377; Turner et al., 1987, /. Ain. Chem. Soc. 109:3783-3785)

Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia del ácido nucleico (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9,10 de 10 que son el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % complementarios). "Perfectamente complementario" o 100 % de complementariedad significa que todos los restos contiguos de una secuencia del ácido nucleico se unirán al hidrógeno con el mismo número de restos contiguos en una segunda secuencia del ácido nucleico. Menos de complementariedad perfecta se refiere a la situación en la que algunas unidades de nucleósidos de dos cadenas, pero no todas, se pueden unir por hidrógeno entre sí. "Complementariedad sustancial" se refiere a cadenas de polinucleótidos que presentan 90 % o mayor complementariedad, excluyendo regiones de las cadenas de polinucleótidos, tales como nucleótidos protuberantes, que se seleccionan de manera que sean no complementarios. La unión específica requiere un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico con secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, por ejemplo, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos. En algunas realizaciones, las secuencias no diana se diferencian de secuencias diana correspondientes en al menos 5 nucleótidos.

Cuando se usan como terapéuticos, en el presente documento se desvela dentro del contexto de la invención que un oligonucleótido proporcionado se administra como una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótido proporcionado que comprende, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un principio inactivo farmacéuticamente aceptable seleccionados de diluyentes farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticamente aceptables y vehículos farmacéuticamente aceptables. En otra realización, la composición farmacéutica se formula para inyección intravenosa, administración por vía oral, administración por vía oral, inhalación, nasal administración, administración tópica, administración oftálmica u administración ótica. En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica es un comprimido, una píldora, una cápsula, un líquido, un inhalante, una disolución en spray nasal, un supositorio, una suspensión, un gel, un coloide, una dispersión, una suspensión, una disolución, una emulsión, una pomada, una loción, un colirio o una gota ótica.

### **Composiciones farmacéuticas**

Cuando se usan como terapéuticos, en el presente documento se desvela dentro del contexto de la invención que un oligonucleótido proporcionado o composición de oligonucleótidos descrita en el presente documento se administra como una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un oligonucleótidos proporcionado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y al menos un principio inactivo farmacéuticamente aceptable seleccionado de diluyentes farmacéuticamente aceptables, excipientes farmacéuticamente aceptables y vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se formula para inyección intravenosa, administración por vía oral, administración por vía oral, inhalación, administración nasal, administración tópica, administración oftálmica o administración ótica. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es un comprimido, una píldora, una cápsula, un líquido, un inhalante, una disolución en spray nasal, un supositorio, una suspensión, un gel, un coloide, una dispersión, una suspensión, una disolución, una emulsión, una pomada, una loción, un colirio o una gota ótica.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende oligonucleótido quiralmente controlado, o composición del mismo, en mezcla con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un experto en la técnica reconocerá que las composiciones farmacéuticas incluyen las sales farmacéuticamente aceptables del oligonucleótido quiralmente controlado, o composición del mismo, descritas anteriormente.

Se puede usar una variedad de nanovehículos supramoleculares para suministrar los ácidos nucleicos. Los nanovehículos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, liposomas, complejos de polímeros catiónicos y diversas poliméricas. La complejación de ácidos nucleicos con diversos policationes es otro enfoque para suministro intracelular; esto incluye el uso de policationes PEGilados, complejos de polietilamina (PEI), copolímeros de bloque catiónicos y dendrímeros. Varios nanovehículos catiónicos, que incluyen PEI y dendrímeros de poliamidoamina, ayudan a liberar el contenido de los endosomas. Otros enfoques incluyen el uso de nanopartículas poliméricas, micelas de polímero, puntos cuánticos y lipoplejos.

Se conocen estrategias de suministro de ácidos nucleicos adicionales, además de las estrategias de suministro a modo de ejemplo descritas en el presente documento.

En las aplicaciones terapéuticas y/o de diagnóstico, los compuestos de la invención se pueden formular para una variedad de modos de administración, que incluyen administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones se pueden encontrar, en general, en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, (20ª ed. 2000).

Los oligonucleótidos proporcionados, y las composiciones de los mismos, son eficaces en un amplio intervalo de dosis. Por ejemplo, en el tratamiento de seres humanos adultos, desde aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 100 mg, desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 50 mg por día, y desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 100 mg por día son ejemplos de dosis que se pueden usar. La dosis exacta dependerá de la vía de administración, la forma en la que se administra el compuesto, el sujeto que se va a tratar, el peso corporal del sujeto que se va a tratar y la preferencia y experiencia del médico adjunto.

Los expertos habituales en la técnica conocen bien, en general, las sales farmacéuticamente aceptables y pueden incluir, a modo de ejemplo pero no de limitación, acetato, bencenosulfonato, besilato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato de calcio, camsilato, carbonato, citrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, hidrabamina, bromhidrato, clorhidrato, hidroxinaftoato, yoduro, isetionato, lactato, lactobionato, malato, maleato, mandelato, mesilato, mucato, napsilato, nitrato, pamoato (embonato), pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, subacetato, succinato, sulfato, tanato, tartrato o teocato. Otras sales farmacéuticamente aceptables se pueden encontrar en, por ejemplo, Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed. 2000). Las sales farmacéuticamente aceptables preferidas incluyen, por ejemplo, acetato, benzoato, bromuro, carbonato, citrato, gluconato, bromhidrato, clorhidrato, maleato, mesilato, napsilato, pamoato (embonato), fosfato, salicilato, succinato, sulfato o tartrato.

Dependiendo de las afecciones específicas que están tratándose, dichos agentes se pueden formular en formas farmacéuticas líquidas o sólidas y se administran por vía sistémica o por vía local. Los agentes se pueden administrar, por ejemplo, en una forma de liberación lenta diferida o sostenida como conocen los expertos en la técnica. Las técnicas para la formulación y administración se pueden encontrar en Remington, The Science and Practice of Pharmacy (20ª ed. 2000). Vías adecuadas pueden incluir oral, bucal, por espray para inhalación, sublingual, rectal, transdérmica, vaginal, transmucosa, administración nasal o intestinal; administración parenteral, que incluye intramuscular, subcutánea, inyecciones intramedulares, así como inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intrarticulares, intraesternales, intrasinoviales, intrahepáticas, intralesionales, intracraneales, intraperitoneales, intranasales o intraoculares, u otros modos de administración.

Para inyección, los agentes de la invención se pueden formular y diluir en disoluciones acuosas, tal como en tampones fisiológicamente compatibles, tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. Para dicha administración transmucosa, en la formulación se usan penetrantes apropiados para la barrera que se va a atravesar. Dichos penetrantes se conocen, en general, en la técnica.

El uso de vehículos inertes farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos desvelados en el presente documento para la práctica de la invención en dosis adecuadas para administración sistémica está dentro del alcance de la invención. Con la elección apropiada del vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente invención, en particular, las formuladas como disoluciones, se pueden administrar por vía parenteral, tal como por inyección intravenosa.

Los compuestos se pueden formular fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosis adecuadas para administración por vía oral. Dichos vehículos permiten que los compuestos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto (por ejemplo, paciente) que se va a tratar.

Para administración nasal o por inhalación, los agentes de la invención también se pueden formular por métodos conocidos por los expertos en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, pero no se limitan a, ejemplos de sustancias solubilizantes, diluyentes o dispersantes, tales como solución salina, conservantes, tales como alcohol bencílico, promotores de la absorción y fluorocarbonos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en la presente invención incluyen composiciones en donde los principios activos están contenidos en una cantidad eficaz para lograr su fin previsto. La determinación de las cantidades eficaces está perfectamente dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Además de los principios activos, estas composiciones farmacéuticas pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados que comprenden excipientes y auxiliares que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. Las preparaciones formuladas para administración por vía oral pueden estar en forma de comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, cápsulas o disoluciones.



Las preparaciones farmacéuticas para uso oral se pueden obtener combinando los compuestos activos con excipientes sólidos, opcionalmente triturando una mezcla resultante, y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea, para obtener comprimidos o núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar. Los excipientes adecuados son, en particular, cargas tales como azúcares, que incluyen lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol; preparaciones de celulosa, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica (CMC) y/o polivinilpirrolidona (PVP: povidona). Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico, o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

5  
10  
15 Se proporcionan núcleos de comprimidos recubiertos de azúcar con recubrimientos adecuados. Para este fin, se pueden usar disoluciones concentradas de azúcar, que pueden contener opcionalmente goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol (PEG) y/o dióxido de titanio, disoluciones de laca, y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes. Se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de comprimidos recubiertos de azúcar para identificación o para caracterizar diferentes combinaciones de dosis de compuesto activo.

20 Las preparaciones farmacéuticas que se pueden usar por vía oral incluyen cápsulas duras hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina, y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol. Las cápsulas duras pueden contener los principios activos en mezcla con carga, tales como lactosa, aglutinantes tales como almidones, y/o lubricantes tales como talco o estearato de magnesio y, opcionalmente, estabilizadores. En las cápsulas blandas, los compuestos activos se pueden disolver o suspender en líquidos adecuados, tales como aceites grasos, parafina líquida o polietilenglicoles (PEG) líquidos. Además, se pueden añadir estabilizadores.

25 Dependiendo de la afección particular, o estado de enfermedad, que se va a tratar o prevenir, se pueden administrar agentes terapéuticos adicionales, que normalmente se administran para tratar o prevenir esa afección, junto con los oligonucleótidos de la presente invención. Por ejemplo, se pueden combinar agentes quimioterapéuticos u otros agentes antiproliferativos con los oligonucleótidos de la presente invención para tratar enfermedades proliferativas y cáncer. Los ejemplos de agentes quimioterapéuticos conocidos incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, dexametasona, vincristina, ciclofosfamida, fluorouracilo, topotecán, taxol, interferones y derivados de platino.

30 La función y ventaja de estas y otras realizaciones de la presente invención será más completamente entendida a partir de los ejemplos descritos a continuación. Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar los beneficios de la presente invención, pero no ejemplifican el alcance completo de la invención.

35 En el presente documento también se desvela una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 1) una secuencia de bases y longitud comunes;
- 40 2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y
- 3) un patrón común de centros quirales del esqueleto, composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto.

45 En algunas realizaciones de la invención, se modifican una o más bases. En algunas realizaciones de la invención, ninguna de las bases se modifica.

50 La secuencia de bases común, como se desvela en el presente documento, puede tener al menos 8 bases. La secuencia de bases común, como se desvela en el presente documento, puede tener al menos 10 bases. Según la invención, la secuencia de bases común tiene al menos 15 bases.

55 En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 20 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 50 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 80 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 85 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 90 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 95 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes,

- el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 97 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 98 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto. En algunas realizaciones de la invención, al menos aproximadamente el 99 % de los oligonucleótidos en la composición tiene la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto.
- En algunas realizaciones de la invención, el único oligonucleótido comprende uno o más enlaces fosfato modificados quirales.
- Según la invención, el único oligonucleótido tiene una estructura de ala-núcleo-ala. En algunas realizaciones de la invención, cada ala contiene enlaces internucleotídicos opcionalmente quirales. En algunas realizaciones de la invención, los enlaces nucleotídicos quirales dentro de cada ala tienen independientemente la misma estereoquímica. En algunas realizaciones de la invención, los enlaces nucleotídicos quirales de ambas alas son de la misma estereoquímica. En algunas realizaciones de la invención, los enlaces nucleotídicos quirales dentro de cada ala tienen independientemente la misma estereoquímica, y la estereoquímica de la primera ala es diferente de la de la segunda ala.
- Según la invención, la primera región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la primera región de ala tiene independientemente una longitud de dos o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la primera región de ala tiene independientemente una longitud de tres o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la primera región de ala tiene independientemente una longitud de cuatro o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la primera región de ala tiene independientemente una longitud de cinco o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la primera región de ala tiene independientemente una longitud inferior a ocho bases.
- Según la invención, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de dos o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de tres o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de cuatro o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de cinco o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud inferior a ocho bases.
- La región de núcleo, como se desvela en el presente documento, puede tener una longitud de cinco o más bases. Según la invención, la región de núcleo tiene una longitud de seis o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la región de núcleo tiene una longitud de siete o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la región de núcleo tiene una longitud de ocho o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la región de núcleo tiene una longitud de nueve o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la región de núcleo tiene una longitud de 10 o más bases. En algunas realizaciones de la invención, la región de núcleo tiene una longitud de 15 o más bases.
- La región de núcleo, como se desvela en el presente documento, puede tener un patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico. El patrón repetido de estereoquímica de enlace internucleotídico, como se desvela en el presente documento, puede ser  $(Sp)_m(Rp)_n$  o  $(Rp)_n(Sp)_m$ , en donde cada uno de  $m$  y  $n$  es independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;  $m$  puede ser superior a  $n$ , es decir,  $m > n$ ;  $n$  pueden ser 1. Por tanto, la región de núcleo, como se desvela en el presente documento, puede comprender un patrón estereoquímico de enlaces internucleotídicos de  $(Sp)_m(Rp)_n$  o  $(Rp)_n(Sp)_m$ , en donde cada uno de  $m$  y  $n$  es independientemente 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8;  $m$  puede ser superior a  $n$ , es decir,  $m > n$ ; según la invención,  $n$  es 1.
- En algunas realizaciones de la invención, el 50 % por ciento o más de los enlaces nucleotídicos quirales de la región de núcleo tienen configuración  $Sp$ . En algunas realizaciones de la invención, el 60 % por ciento o más de los enlaces nucleotídicos quirales de la región de núcleo tienen configuración  $Sp$ .
- En algunas realizaciones de la invención, el enlace internucleotídico quiral tiene la estructura de la fórmula I.
- En algunas realizaciones de la invención,  $(Sp)_m(Rp)_n$  o  $(Rp)_n(Sp)_m$  es SSR. En el presente documento también se desvela que  $(Sp)_m(Rp)_n$  o  $(Rp)_n(Sp)_m$  puede ser RRS.
- Un patrón de repetición, como se desvela en el presente documento, puede ser un motivo que comprende al menos aproximadamente el 20 % de centros quirales del esqueleto en la conformación  $Sp$ . Un patrón de repetición, como se desvela en el presente documento, puede ser un motivo que comprende al menos aproximadamente el 50 % de centros quirales del esqueleto en la conformación  $Sp$ . En algunas realizaciones de la invención, un patrón de repetición es un motivo que comprende al menos aproximadamente el 66 % de centros quirales del esqueleto en la conformación

Sp. En algunas realizaciones de la invención, un patrón de repetición es un motivo que comprende al menos aproximadamente el 75 % de centros quirales del esqueleto en la conformación Sp. En algunas realizaciones de la invención, un patrón de repetición es un motivo que comprende al menos aproximadamente el 80 % de centros quirales del esqueleto en la conformación Sp.

## Ejemplificación

Lo anterior ha sido una descripción de ciertas realizaciones no limitantes de la invención. Por consiguiente, se debe entender que las realizaciones de la invención descritas en el presente documento son simplemente ilustrativas de la aplicación de los principios de la invención. Referencia en el presente documento a detalles de la realización ilustrada no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

### Ejemplo 1. Estabilidades metabólicas in vitro de quiomersen humanos en homogeneizados de hígado completo de rata preincubados

El presente ejemplo describe comparaciones de estabilidad de homogeneizados de hígado completo de rata *in vitro* de mipomersen (mezcla estereoquímica) con composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados de mipomersen ("quiomersen"). El método es útil, entre otras cosas, en el cribado de compuestos para predecir semividas *in vivo*.

Como se conoce en la técnica, mipomersen (previamente ISIS 301012, comercializado con el nombre comercial Kynamro) es un oligonucleótido 20mero cuya secuencia de bases es antisentido a una porción del gen de la apolipoproteína B. Mipomersen inhibe la expresión génica de la apolipoproteína B, supuestamente por direccionamiento del ARNm. Mipomersen tiene la siguiente estructura:

G\*-C\*-C\*-U\*-C\*-dA-dG-dT-dC-dT-dG-dmC-dT-dT-dmC-G\*-C\*-A\*-C\*-C\* (SEQ ID NO: 65)

[d = 2'-desoxi, \* = 2'-O-(2-metoxietil)] con enlaces fosforotioatos 3'→5'. Por lo tanto, mipomersen tiene restos de ribosa modificados con 2'-O-metoxietilo en ambos extremos, y restos de desoxirribosa en el centro.

Los análogos de mipomersen quiralmente puros probados descritos en este ejemplo incluyeron los enlaces fosforotioato 3'→5'. En algunas realizaciones, los análogos probados incluyen uno o más restos modificados con 2'-O-(2-metoxietilo); en algunas realizaciones, los análogos probados incluyen solo restos 2'-desoxi. Los análogos probados particulares tuvieron las estructuras expuestas a continuación en las Tablas 3 y 4.

**Protocolo:** Los presentes inventores usaron el protocolo informado por Geary et al. (Oligonucleotides, volumen 20, número 6, 2010) con algunas modificaciones.

**Sistema de prueba:** Fueron suministradas seis ratas Sprague-Dawley macho (*Rattus norvegicus*) por Charles River Laboratories, Inc., (Hollister, CA), y se recibieron en SNBL USA.

**Recogida de tejido:** Se aclimató a los animales a la sala del estudio durante dos días antes de la recogida del tejido. En el momento de la recogida de tejido, los animales se anestesiaron con una inyección intraperitoneal (IP) de disolución de pentobarbital sódico. La perfusión del hígado se realizó usando 500 ml de solución salina enfriada/animal, administrada por la vena porta hepática. Después de la perfusión, se diseccionaron los hígados y se mantuvieron sobre hielo. Los hígados se trituraron en trozos pequeños, luego se pesaron.

**Preparación de homogeneizado de hígado:** Se transfirieron los trozos triturados de tejidos de hígado a tubos de centrifugadora tarados de 50 ml y se pesaron. Se añadió tampón de homogenización enfriado (Tris 100 mM a pH 8,0, acetato de magnesio 1 mM, con antibióticos-antimicóticos) a cada tubo, de forma que el (los) tubo(s) contuviera(n) 5 ml de tampón por gramo de tejido. Usando un homogeneizador de tejido TissueRuptor de QIAGEN, se homogeneizó la mezcla de hígado/tampón mientras se mantenía el tubo sobre hielo. Se determinó la concentración de proteína del conjunto de homogeneizado de hígado usando un ensayo de proteína BCA de Pierce. Se dividieron los homogeneizados de hígado en alícuotas de 5 ml, se transfirieron a crioviales etiquetados de tamaño apropiado y se guardaron a -60 °C.

**Condiciones de incubación:** Se descongelaron alícuotas de 5 ml de homogeneizado de hígado congelado (concentración de proteína = 22,48 mg/ml) y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se cogieron seis tubos Eppendorf (2 ml) para cada oligómero en la Tabla 1 y se añadió 450 ul de homogeneizado a cada tubo. Se añadió 50 ul de ASO (200 uM) a cada tubo. Inmediatamente después de la mezcla, se añadió 125 ul de (5X) tampón de terminación (2,5 % de IGEPAL, NaCl 0,5 M, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, pH=8,0) y 12,5 ul de 20 mg/ml de proteinasa K (Ambion, N.º AM2546) a un tubo durante el momento de tiempo 0 horas. Las mezclas de reacción restantes se incubaron a 37 °C con agitación a 400 rpm en un agitador de microplacas de incubación VWR. Después de la incubación durante un periodo designado (1, 2, 3, 4 y 5 días), cada mezcla se trató con 125 ul de (5X) tampón de terminación (2,5 % de IGEPAL, NaCl 0,5 M, EDTA 5 mM, Tris 50 mM, pH=8,0) y 12,5 ul de 20 mg/ml de proteinasa K (Ambion, N.º AM2546).

5 **Procesamiento y bioanálisis:** Se usó ISIS 355868 (5'-GCGTTTGCTCTTCTTCTTGCGTTTTT-3' (SEQ ID NO: 238)), un oligonucleótido 27mero (las bases subrayadas están modificadas con MOE) como patrón interno para la cuantificación de quiromersen. Se añadió 50 ul de patrón interno (200 uM) a cada tubo, seguido por la adición de 250 ul de 30 % de hidróxido de amonio, 800 ul de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Después de la mezcla y centrifugación a 600 rpg, se evaporó la fase acuosa en SpeedVac hasta 100 ul y se cargó sobre una columna Sep Pak (C18, 1 g, WA 036905). Todos los lavados acuosos (2x20 ml) de la columna Sep Pak se probaron con el método de intercambio iónico rápido para garantizar que no se encontró producto allí. Se usó 50 % de ACN (3,5 ml) para eluir el oligonucleótido y los metabolitos y la columna se lavó adicionalmente con 70 % de CAN (3,5) para garantizar que no quedaba nada en la columna. Se recogieron cinco fracciones para cada secuencia. Lavado con agua 1, 2, 3, ACN1 y 2 usando el sistema Visiprep (Sigma, número de pieza: 57031-U).

#### Método de intercambio iónico

	Tiempo	Flujo (ml/min)	% de A	% de B	Curva
	Tiempo	1,0	95	5	
1	2	1,0	95	5	1
2	3	1,0	75	25	6
3	10	1,0	35	65	6
4	10,1	1,0	95	5	6
5	12,5	1,0	95	5	1

15 Tampón A = Tris HCl 10 mM, 50 % de ACN, pH=8,0

Tampón B = A + NaClO<sub>4</sub> 800 mM

20 Columna = DNA pac 100

Temperatura de la columna 60 °C

Se usó el método de lavado después de cada serie (descrito en M9-Exp21) usando los mismos tampones que antes y 50:50 (metanol:agua) en la línea de tampón C.

	Tiempo	Flujo (ml/min)	% de A	% de B	% de C	Curva
	Tiempo	1,0	0	0	100	
1	5,5	1,0	0	0	100	1
2	5,6	1,0	100	0	0	6
3	7,5	1,0	100	0	0	6
4	7,6	1,0	95	5	0	6
5	12,5	1,0	95	5	0	1

Se concentró el eluato de acetonitrilo a sequedad y se disolvió en 100 ul de agua para ser analizado usando RPHPIPIC.

30 Eluyente A = acetato de tributilamonio 10 mM, pH=7,0

Eluyente B = ACN (calidad para HPLC, B&J)

35 Columna: XTerra MS C18, 3,5 um, 4,6 x 50 mm, número de pieza: 186000432

Precolumna de Phenomenex, número de pieza: KJ0-4282

Temperatura de la columna = 60 °C

**Gradiente de HPLC:**

	Tiempo	Flujo (ml/min)	% de A	% de B	Curva
1		1,0	65	35	
2	5,0	1,0	65	35	1
3	30,0	1,0	40	60	6
4	35,0	1,0	5	90	6
5	36,0	1,0	65	35	6
6	40,0	1,0	65	35	1

- 5 Para RP-HPLC analítica, se añadió 10 ul de esta disolución madre a 40 ul de agua y se inyectó 40 ul.

Tabla 3.

S.NO.	Secuencia	Descripción
ONT-41	Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC (SEQ ID NO: 239)	Mipomersen
ONT-87	Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC (SEQ ID NO: 240)	Diseño MOE-ala-núcleo-ala - sustrato 1 de RNasa H (humana) 5R-(SSR) <sub>3</sub> -5R
ONT-154	Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCsGs5mCsAs5mCs5mC (SEQ ID NO: 241)	Todos desoxi, (5S-(SSR) <sub>3</sub> -5S)
ONT-70	Gs5mCsGsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5mCsTsTsTsTsT (SEQ ID NO: 242)	Patrón interno ISIS 355868 para la cuantificación de mipomersen

**Discusión:** Se predicen modificaciones en 2' en antisentido y ARNip para estabilizar estas moléculas y aumentar su persistencia en plasma y tejidos en comparación con ADN y ARNip no mutantes.

Diseño de 2'-MOE ala-núcleo-ala en mipomersen. Los oligonucleótidos antisentido de primera generación empleados en los primeros ensayos clínicos antisentido tuvieron restos de ribonucleótidos 2'-desoxi y enlaces internucleosídicos fosforotioato. Posteriormente, se desarrollaron los oligonucleótidos antisentido de segunda generación, que fueron los que normalmente se denominan en el presente documento "diseño 5-10-5 2'-MOE ala-núcleo-ala", en los que cinco (5) restos en cada extremo fueron restos modificados con 2'-O-metoxietilo (2'-MOE) y diez (10) restos en el centro fueron ribonucleótidos 2'-desoxi; los enlaces internucleosídicos de dichos oligonucleótidos fueron fosforotioatos. Dichos oligonucleótidos "5-10-5 2'-MOE ala-núcleo-ala" presentaron una mejoría importante en la potencia con respecto a la primera generación (documento de patente PCT/US2005/033837). Se diseñaron motivos similares de ala-núcleo-ala como 2-16-2, 3-14-3, 4-12-4 o 5-10-5 para mejorar la estabilidad de oligonucleótidos a las nucleasas, mientras que al mismo tiempo se mantenía una estructura de ADN suficiente para la actividad de RNasa.

Oligonucleótidos quiralmente puros. La presente invención proporciona oligonucleótidos quiralmente puros y demuestra, entre otras cosas, que la selección de estereoquímica en sí misma puede mejorar la estabilidad de los oligonucleótidos (es decir, independiente de la modificación de restos, tal como la modificación con 2'MOE). De hecho, la presente invención demuestra que los oligonucleótidos de fosforotioato quiralmente puros pueden proporcionar la misma estabilidad o mejor que los compuestos de fosforotioato estereoaleatorios modificados en 2' correspondientes.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos quiralmente puros probados son de la estructura general X-Y-X con respecto a la estereoquímica en la que contienen regiones de ala "X" (normalmente aproximadamente 1-10 restos de longitud) donde todos los restos tienen la misma estereoquímica que flanquea una región de núcleo "Y" en la que varía la estereoquímica. En muchas realizaciones, aproximadamente el 20-50 % de los análogos de nucleótidos en dichos oligonucleótidos probados no son sustratos para RNasa H. La capacidad para controlar la estereoquímica de los fosforotioatos en el ADN permite a los presentes inventores proteger los oligómeros de la degradación por nucleasas, mientras se mantienen los sitios activos de RNasa. Uno de estos diseños es ONT-154, donde las alas del oligonucleótido han sido estabilizadas por la química de fosforotioato Sp con retención de algunos fosforotioatos Rp que son mejores sustratos para la RNasa H (Molecular Cell, 2007). La estructura cristalina de la RNasa H humana complejada con el dúplex de ADN/ARN muestra que el sitio de unión al fosfato de la enzima hace contactos con cuatro fosfatos de ADN contiguos. Parece que los tres primeros contactos son más fuertes que el cuarto y prefieren átomos de oxígeno de Pro-R/Pro-R/Pro-S de cada uno de estos tres fosfatos. Combinando la ventaja de estabilidad procedente de la estereoquímica de Sp con sitios activos de RNasa H, se pueden diseñar varias secuencias para competir con/o mejorar tras las modificaciones en 2'. A partir del experimento de estabilidad de homogeneizados de hígado completo de rata que compara mipomersen (ONT-41) con el diseño racional de los presentes inventores (control quiral) con y sin modificaciones en 2' (ONT-87 y ONT-154) (Tabla 1 y Figura 1), es evidente que mediante la retirada de las modificaciones en 2' y el cuidadoso control quiral con fosforotioatos Rp y Sp, los presentes inventores pueden mejorar la estabilidad de estos oligonucleótidos que después afectan la eficacia *in vivo*.

**Tabla 4. Quiromersen hu estudiados para estabilidad de homogeneizados de hígado completo de rata**

Secuencia	Descripción	Diana	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-41	<u>Gs5mCs5mCs Ts5mCsAs GsTs5mCs TsGs5mCs</u> <u>TsTs5mCs Gs5mCsAs 5mCs5mC</u>	ApoB hu	80,7	243
ONT-75	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGs Ts5mCsTsGs5mCsTsTs</u> <u>5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	85,0	244
ONT-77	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCsAsGs Ts5mCsTsGs5mCsTsTs</u> <u>5mCsGs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	79,9	245

Secuencia	Descripción	Diana	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-80	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCs</u> AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5 mCs <u>Gs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	75,8	246
ONT-81	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCs</u> AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5 mCs <u>Gs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	80,7	247
ONT-87	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCs</u> AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5 mCs <u>Gs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	82,4	248
ONT-88	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCs</u> AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5 mCs <u>Gs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	78,9	249
ONT-89	<u>Gs5mCs5mCsTs5mCs</u> AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5 mCs <u>Gs5mCsAs5mCs5mC</u>	ApoB hu	80,9	250
ONT-70	<u>Gs5mCsGsTsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs5m</u> <u>CsTsTsGs5mCGsTsTsTsTsT</u>	Patrón interno ISIS 355868		251

Tabla 5. Quiromersen de ratón estudiados para estabilidad de homogeneizados de hígado completo de rata

Secuencia	Descripción	Diana	SEQ ID NO:
ONT-83	<u>GsTs5mCs5mCs5mCs</u> TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs <u>AsAsTsGs5mC</u>	ApoB de ratón	252
ONT-82	<u>GsTs5mCs5mCs5mCs</u> TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs <u>AsAsTsGs5mC</u>	ApoB de ratón	253
ONT-84	<u>GsTs5mCs5mCs5mCs</u> TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs <u>AsAsTsGs5mC</u>	ApoB de ratón	254
ONT-85	<u>GsTs5mCs5mCs5mCs</u> TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs <u>AsAsTsGs5mC</u>	ApoB de ratón	255
ONT-86	<u>GsTs5mCs5mCs5mCs</u> TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs <u>AsAsTsGs5mC</u>	ApoB de ratón	256



**Ejemplo 2. Moléculas de ARNip quiralmente controlado a modo de ejemplo**

Tabla 1. Resumen de interacciones polares de fosfodiéster con h-Ago-2 y h-Ago-1

Science 2012 hAgo-2				Célula 2012 hAgo-2				Célula Rep 2013, h-Ago-1†				
Fosfato*	Resto	Longitud/Å	Config	Fosfato	Resto	Longitud/Å	Config	Fosfato	Resto	Longitud/Å	Config	
2	Asn551	2,7	Pro(S)	2	Asn551	2,7	Pro(S)	2	Asn549	2,7	Pro(S)	
	Gln548	2,9	Pro(S)		Gln548	3,1	Pro(S)		Gln546	2,9	Pro(S)	
3	Lys566	3,1	Pro(R)	3	Lys566	2,9	Pro(R)	2	Lys564	2,9	Pro(R)	
	Arg792	3,4	Pro(R)		Arg792	3,3	Pro(R)		Arg790	3,4	Pro(R)	
4	Tyr790	2,6	Pro(R)	4	Tyr790	2,8	Pro(R)	4	Tyr788	2,7	Pro(R)	
	Arg792	3,0	Pro(R)		Arg792	2,8	Pro(R)		Arg790	3,3	Pro(R)	
		2,8	Pro(R)									
		3,4	Pro(S)									
5	Ser798	2,7	Pro(R)	5	Ser798	2,6	Pro(R)	5	Ser796	2,5	Pro(R)	
		2,9	Pro(R)			2,9	Pro(R)			2,8	Pro(R)	
	Tyr804	2,8	Pro(S)		Tyr804	2,5	Pro(S)		Tyr802	2,6	Pro(S)	
6	Lys709	3,0	Pro(S)	6	Lys709	3,2	Pro(S)	6	Lys707	2,8	Pro(S)	
	Arg761	2,9	Pro(R)		Arg761	2,8	Pro(R)		Arg759	2,7	Pro(R)	
	His753	2,8	Pro(R)		His753	3,0	Pro(R)		His751	3,0	Pro(R)	
7	Arg714	2,9	Pro(R)	7	Arg714	2,8	Pro(R)	7	Arg712	3,1	Pro(S)	
		3,0	Pro(R)			3,1	Pro(R)			3,3	Pro(S)	
	Arg761	3,0	Pro(S)		Arg761	2,8	Pro(S)		Arg373	3,4	Pro(R)	
				Arg761	2,4	Pro(S)	Thr757	2,9	Pro(R)			
				Ala221	3,5	Pro(R)	Arg759	2,2	Pro(S)			
							His710	3,4	Pro(R)			
							Ser218	2,7	Pro(R)			
				9	Arg351	2,2	Pro(R)	9	Arg349	3,5	Pro(R)	
								Arg708	2,9	Pro(S)		
				10	Arg710	2,5	Pro(R)	10	Arg708	3,2	Pro(R)	
									2,9	Pro(R)		
				18	Sin contactos			21	Tyr309	2,6	Pro(S)	
				19	Tyr311	3,1	Pro(R)		Tyr314	2,6	Pro(S)	
					Arg315	2,8	Pro(R)		His269	3,0	Pro(R)	
				20	His271	3,1	Pro(R)					
					His319	3,4	Pro(S)					
					Tyr311	2,2	Pro(S)					

\*N.º de fosfato desde el extremo 5'

†Complejado con h-let-7 22 mero

La presente invención, a pesar de las enseñanzas de la técnica en sentido contrario, reconoce que la estereoquímica del enlace internucleotídico se puede utilizar para aumentar la estabilidad y la actividad de oligonucleótidos mediante composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados. Dichas composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados pueden proporcionar resultados mucho mejores que las composiciones de oligonucleótidos quiralmente no controlados, como se demuestra en la presente divulgación.

Se ha informado de dos estructuras cristalinas de ARN complejado con la proteína Argonaute-2 humana (hAgo2): La estructura cristalina de Argonaute-2 humana, Science, 2012 (PDB-4ei3); y la estructura de Argonaute-2 humana en complejo con la célula miR-20a, 2012 PDB-4f3t). Además, se ha informado de una estructura cristalina de ARN de Let-7 complejado con la proteína Argonaute-1 humana (hAgo-1): The Making of a Slicer: Activation of Human Argonaute-1, Cell Rep. 2013 (PDB-4krf).

Basándose en la información contenida en estas publicaciones, se esperó que se pudieran dar algunas opiniones sobre preferencias ventajosas de estereoquímica en el enlace internucleotídico fosfato si los enlaces fosfodiéster se fueran a sustituir por enlaces diéster de fosforotioato. Estas ventajas podrían referirse a una potencia, estabilidad y otras propiedades farmacológicas significativamente mejoradas. Con esto en mente, se usó el programa informático Pymol para localizar todas las interacciones polares entre la proteína y el enlace internucleotídico fosfodiéster del ARN cristalizado para las tres estructuras. Se ignoraron las interacciones polares en una distancia superior a 3,5 Å.

Los resultados de este análisis se resumen en la Tabla 1. A un átomo de fósforo particular del esqueleto de fosfodiéster en el ARN se le asignó la configuración Pro(R) o Pro(S) basándose en la suposición de que en el análogo de diéster de fosforotioato el enlace bastante similar se haría entre el grupo en un resto de aminoácido y el átomo de oxígeno del fosfato respectivo. La sustitución del azufre, en lugar del oxígeno no de puente, conferiría, por lo tanto, una estereoquímica única (ya sea la configuración absoluta (Sp) o (Rp)) en el átomo de fósforo dentro de ese motivo.

Cabe destacar la extraordinaria concordancia entre las dos estructuras de hAgo-2 en complejo con ARN. Por tanto, hay una excelente concordancia entre las estructuras de hAgo-1 y hAgo-2 en complejo con ARN, que indica que la conformación que la molécula de ARN adopta está altamente conservada entre estas dos proteínas. Por lo tanto, es probable que cualquier conclusión o regla que se forme basándose en los resultados de este análisis sea válida para ambas moléculas de proteínas

Como se puede apreciar, normalmente hay más de una interacción polar en un grupo fosfodiéster cualquiera, con la excepción de aquellas entre los fosfodiésteres en las posiciones de fosfato 9 y 10 y hAgo-2 (célula 2012) que adoptan exclusivamente la preferencia Pro(Rp) mediante la unión con Arg351 y Arg710, respectivamente.

5 Sin embargo, distancias más cortas (correspondientes a interacciones más fuertes), así como el número de enlaces por oxígeno, pueden sugerir una interacción predominante para los oxígenos Pro(Rp) o Pro(Sp): dando como resultado, por lo tanto, varias interacciones que son predominantemente de un tipo estereoquímico o el otro. Dentro de este grupo están las interacciones entre los fosfodiésteres en las posiciones de fosfato 2 (Sp), 3 (Rp), 4 (Rp), 6 (Rp), 8 (Sp), 19 (Rp), 20 (Sp) y 21 (Sp).

10 De las restantes interacciones, no parece que haya una preferencia de que se adopte una estereoquímica particular con respecto a la otra, por lo que la estereoquímica preferida podría ser o (Sp) o (Rp).

15 Dentro de esta categoría están las interacciones formadas entre los fosfodiésteres en las posiciones de fosfato 5 (Rp o Sp) y 7 (Rp o Sp).

20 Para las interacciones en el otro esqueleto de fosfato, no hay información de estructura cristalina, por lo que la estereoquímica en estas posiciones puede ser similarmente o (Rp) o (Sp) hasta que los datos empíricos muestren lo contrario.

25 Para este fin, la Tabla 6 contiene varias construcciones generales de ARNip a modo de ejemplo no limitantes que pueden ser concebidas para aprovecharse de esta preferencia de estereoquímica en motivos de diéster de fosforotioato individuales.

**Tabla 6. Construcciones de ARNip general a modo de ejemplo**

PS*	Construcción de cadena no codificante quiralmente controlada					
2	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)
3	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)
4	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
5	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
6	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
7	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
8	(Sp)	(Rp)	PO	PO	(Sp)	(Rp)
9	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
10	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
11	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
12	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
13	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
14	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
15	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
16	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
17	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
18	(Rp) o (Sp)	(Sp) o (Rp)	PO	PO	PO	PO
19	(Rp)	(Sp)	PO	PO	(Rp)	(Sp)
20	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)
21	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)	(Sp)	(Rp)

\*El número indica la posición de fosfato desde el extremo 5' de la cadena no codificante del ARNip, (por ejemplo, N.º 2 se localiza entre los nucleótidos 1 y 2 y N.º 21 se localiza entre los nucleótidos 20 y 21). (Sp) y (Rp) designa la estereoquímica del átomo de fósforo en el enlace internucleotídico de diéster de fosforotioato (PS) en la posición indicada. PO designa un enlace internucleotídico de fosfodiéster en la posición indicada.

Los ARNip a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, ARNip que tienen una configuración Sp para un fosforotioato quirál en el extremo 3' y en el extremo 5' de la cadena no codificante del dúplex de ARNip, que confiere sin precedentes una elevada estabilidad en suero humano o líquidos biológicos. Esa misma configuración Sp para el fosforotioato quirál en el extremo 3' y en el extremo 5' de la cadena no codificante del dúplex de ARNip confiere sin precedentes una elevada potencia biológica causada por la elevada afinidad con la proteína Ago2, que conduce a un aumento de la actividad dentro del complejo de silenciamiento de iARN RISC.

En una realización, un único motivo de fosforotioato quirál se introduce independientemente en cada posición a lo largo de la cadena antisentido o codificante de la molécula de ARNip. Para un 21mero, esto proporciona 80 secuencias únicas, con un grupo fosforotioato quirálmente controlado (Sp) o (Rp). Cuando se duplexa independientemente, se preparan 1600 combinaciones únicas de ARNip.

#### Transfección de ARNip de moléculas de ARNip quirál

Se transfecta de forma inversa células Hep3B, o HeLa, a una densidad de  $2,0 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pocillos. La transfección de ARNip se lleva a cabo con Lipofectamine RNAiMax (Life Technologies, cat. N.º 13778-150) usando el protocolo del fabricante, excepto con una cantidad reducida de Lipofectamine RNAiMax de 0,2 ul por pocillo. Se crean doce diluciones 1:3 de dúplex de ARNip empezando en 1uM. Entonces se lipoplejan 10 ul de  $10 \times$  dúplex de ARNip con una mezcla preparada de 9,8 ul de medio sin suero y 0,2 ul de Lipofectamine RNAiMax por pocillo. Después de una incubación de 10-15 minutos, se añaden  $2,0 \times 10^4$  células en 80 ul de medio de crecimiento de células EMEM (ATCC, 30-2003) para llevar el volumen final a 100 ul por pocillo. Se realizan dos acontecimientos de transfección separados para cada dosis.

24 horas después de la transfección, se lisan las células Hep3B o HeLa y se purifica el ARNm contra el que se dirige el ARNip usando el kit de aislamiento de ARN total MagMAX™-96 (Life Technologies, AM1830); se sintetizan 15 ul de ADNc con el kit de retrotranscripción de ADNc de alta capacidad con inhibidor de RNasa (Life Technologies, 4374967). La expresión génica se evalúa por PCR en tiempo real en un Lightcycler 480 (Roche) usando Probes Master Mix (Roche, 04 707 494 001) según el protocolo del fabricante.

#### IC50 y análisis de datos

Se usa el método de delta delta Ct para calcular los valores. Se normalizaron las muestras con respecto a hGAPDH y se calibraron con respecto a muestras transfectadas con vector vacío y sin tratar. Se usa una molécula estereoealatoria como control. Los datos se representan como la media de 2 duplicados biológicos usando Graphpad Prism. Se ajusta una curva de regresión lineal de cuatro parámetros a los datos y la parte superior y la parte inferior se limitan a constantes de 0 y 100, respectivamente, para calcular una CI50 relativa.

El presente ejemplo demuestra la inhibición satisfactoria de la expresión de genes diana usando agentes de ARNip que comprenden oligonucleótidos quirálmente controlados como se describe en el presente documento. Específicamente, este ejemplo describe la hibridación de cadenas de oligonucleótidos individuales preparadas mediante síntesis quirálmente controlada, como se describe en el presente documento, de manera que se proporcionan composiciones de oligonucleótidos quirálmente controlados de ARNip bicatenario. Este ejemplo demuestra además la satisfactoria transfección de células con dichos agentes y, además la satisfactoria inhibición de la expresión de genes diana.

#### Estabilidades metabólicas in vitro de dúplex de ARNip de PCSK9 humano que tiene enlaces diéster de fosforotioato estereocontrolados en suero humano.

Se incubaron dúplex de ARNip  $10 \mu\text{M}$  en 90 % de suero humano (50  $\mu\text{l}$ , Sigma, H4522) a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Se preparó un punto de tiempo de 0 min (50  $\mu\text{l}$ ), así como un punto de tiempo de incubación de control con PBS (50  $\mu\text{l}$ ), donde el dúplex de ARNip  $10 \mu\text{M}$  se incubó en 90 % de  $1 \times$  PBS (50  $\mu\text{l}$  a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Después de finalizar la incubación, en cada momento de tiempo, se añadieron 10  $\mu\text{l}$  de disolución de parada (NaCl 0,5 M, TRIS 50 mM, EDTA 5 mM, 2,5 % de IGEPAL), seguido por 3,2  $\mu\text{l}$  de proteinasa K (20 mg/ml, Ambion). Las muestras se incubaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 20 min, y luego se centrifugaron a 2000 rpm durante 15 min. Las mezclas de reacción finales se analizaron directamente en IEX HPLC desnaturante (volumen de inyección 50  $\mu\text{l}$ ). Se usó la relación entre el área integrada a las 24 h y 0 min para determinar el % de degradación para cada ARNip.

Se observó que la configuración estereoquímica del único fosforotioato en la posición 21 (extremo 3') de tanto la cadena no codificante como la cadena codificante del ARNip tuvo un impacto crucial sobre la estabilidad del dúplex en la incubación en suero humano (Figura 1). Como se ilustra en la Figura 1 y como se determina siguiendo la relación de integración del patrón de degradación, un dúplex de ARNip (Rp, Rp) presentó una significativa degradación del 55,0 % después de 24 h. La mezcla estereoealatoria de fosforotioatos en el ARNip estereoealatorio mostró una degradación del 25,2 % después de 24 h. El ARNip (Sp/Sp) solo mostró una degradación menor de 7,3 % después de 24 h. Esto ilustra el drástico impacto que la estereoquímica del fosforotioato confiere a ARNip terapéuticos. Datos adicionales a modo de ejemplo se presentaron en la Figura 2, Figura 3, Figura 4 y Figura 5.

Se observa que cada una de las construcciones estereopuras muestra diferente potencia (valores de  $CI_{50}$ ) que depende de la posición del motivo de fosforotioato a lo largo del esqueleto. También se observa que se obtienen diferentes valores de  $CI_{50}$  dependiendo de si el motivo de fosforotioato en cualquier posición individual es (Sp) o (Rp). El impacto de la estereoquímica sobre la estabilidad es asimismo clara y diferenciadora, usando tanto el suero humano descrito anteriormente, o el extracto de citosol hepático humano o la fosfodiesterasa de veneno de serpiente, como la endonucleasa aislada o exonucleasa aislada.

Se pueden formular ciertas reglas de diseño basándose en los datos obtenidos en el ejemplo anterior. Esta información de diseño se puede aplicar a la introducción de múltiples enlaces fosforotioatos quirales dentro de la cadena antisentido y/o codificante del ARNip como se ejemplifica a continuación. La presente invención reconoce que un aumento de la cantidad de fosforotioato quiral dentro de la cadena antisentido y/o codificante del ARNip, introducido en las posiciones izquierdas y que tiene la configuración estereoquímica derecha, conduce a construcciones de ARNip enormemente mejoradas en términos de potencia y estabilidad metabólica *in vitro* – que se traduce en ARNip terapéuticos enormemente potenciados farmacológicamente.

### **Oligonucleótidos de ARNip quiralmemente controlados a modo de ejemplo que se dirigen a PCSK9**

La proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) es una enzima que participa en el metabolismo del colesterol. PCSK9 se une al receptor de la lipoproteína de baja densidad (LDL), desencadenando su destrucción. Aunque la LDL asociada al receptor también se elimina cuando el receptor se destruye, el efecto neto de la unión de PCSK9 aumenta de hecho los niveles de LDL, ya que el receptor volvería de otro modo a la superficie celular y eliminaría más colesterol.

Varias empresas están diseñando agentes terapéuticos que se dirigen a PCSK9. De particular relevancia para la presente divulgación, cada una de Isis Pharmaceuticals, Santaris Pharma y Alnylam Pharmaceuticals están desarrollando un agente de ácido nucleico que inhibe PCSK9. Se ha mostrado que el producto de Isis Pharmaceuticals, un oligonucleótido antisentido, aumenta la expresión de LDLR y disminuye los niveles de colesterol total circulante en ratones (Graham et al., "Antisense inhibition of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 reduces serum LDL in hyperlipidemic mice". J. Lipid Res. 48 (4): 763-7, abril de 2007). Ensayos clínicos iniciales con el producto de Alnylam Pharmaceuticals, ALN-PCS, revelan que la interferencia por ARN ofrece un mecanismo eficaz para inhibir PCSK9 (Frank-Kamenetsky et al., "Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105 (33): 11915-20, agosto de 2008).

En algunas realizaciones, a pesar de los resultados conocidos en sentido contrario, la presente invención reconoce que los motivos de fosforotioato de una conformación estereoquímica u otra pueden ser diseñados racionalmente para aprovecharse de la elevada potencia, estabilidad y otras cualidades farmacológicas mediante las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados. Para reforzar este concepto, la Tabla 3 contiene construcciones estereoquímicamente puras a modo de ejemplo basadas en una secuencia de ARNip que se dirige al ARN mensajero de PCSK9.

En esta realización a modo de ejemplo, un único motivo de fosforotioato quiral se introduce independientemente en cada posición a lo largo de la cadena antisentido o codificante de la molécula de ARNip. Para un 21mero, esto proporciona 80 secuencias únicas, con un grupo fosforotioato quiralmente controlado (Sp) o (Rp). Cuando se duplexa independientemente, se preparan 1600 combinaciones únicas de ARNip.

En otras realizaciones a modo de ejemplo, un único motivo de fosforotioato quiral se introduce independientemente en cada posición a lo largo de la cadena antisentido o codificante de la molécula de ARNip, mientras se conserva un enlace fosforotioato 3'-(Sp). Para un 21mero, esto proporciona otras 80 secuencias únicas adicionales, con un grupo fosforotioato quiralmente controlado (Sp) o (Rp). Cuando se duplexa independientemente, se preparan 1600 combinaciones únicas de ARNip.

En otras realizaciones a modo de ejemplo, se introducen múltiples motivos de fosforotioato quirales independientemente en varias posiciones a lo largo de la cadena antisentido o codificante de la molécula de ARNip, siguiendo los códigos descritos en la Tabla 7, mientras se conserva un enlace fosforotioato 3'-(Sp).

**Tabla 7. Ejemplo de ARN sentido y antisentido de PCSK-9**

	<b>Cadenas codificantes de ARNip de PCSK9</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
PCSK9 (1)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	257
PCSK9 (2)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuudTsdT	258
PCSK9 (3)	(Rp)- uucuAGAccuGuuuuGcuusdTdT	259
PCSK9 (4)	(Sp)- uucuAGAccuGuuuuGcuusdTdT	260

ES 2 917 473 T3

	<b>Cadenas codificantes de ARNip de PCSK9</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
PCSK9 (5)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcusudTdT	261
PCSK9 (6)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcusudTdT	262
PCSK9 (7)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcsuudTdT	263
PCSK9 (8)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcsuudTdT	264
PCSK9 (9)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GscuudTdT	265
PCSK9 (10)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GscuudTdT	266
PCSK9 (11)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	267
PCSK9 (12)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	268
PCSK9 (13)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	269
PCSK9 (14)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	270
PCSK9 (15)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	271
PCSK9 (16)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	272
PCSK9 (17)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	273
PCSK9 (18)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	274
PCSK9 (19)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	275
PCSK9 (20)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> sGcuudTdT	276
PCSK9 (21)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAccu <u>s</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	277
PCSK9 (22)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAccu <u>s</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	278
PCSK9 (23)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAcc <u>su</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	279
PCSK9 (24)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAcc <u>su</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	280
PCSK9 (25)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAcc <u>scu</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	281
PCSK9 (26)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAcc <u>scu</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	282
PCSK9 (27)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGAcc <u>scu</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	283
PCSK9 (28)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGAcc <u>scu</u> G <u>uuuu</u> GcuudTdT	284
PCSK9 (29)	(Rp)- uu <u>cu</u> AGsAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	285
PCSK9 (30)	(Sp)- uu <u>cu</u> AGsAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	286
PCSK9 (31)	(Rp)- uu <u>cu</u> AsGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	287
PCSK9 (32)	(Sp)- uu <u>cu</u> AsGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	288
PCSK9 (33)	(Rp)- uu <u>cu</u> sAGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	289
PCSK9 (34)	(Sp)- uu <u>cu</u> sAGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	290
PCSK9 (35)	(Rp)- uu <u>csu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	291
PCSK9 (36)	(Sp)- uu <u>csu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	292
PCSK9 (37)	(Rp)- uu <u>scu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	293
PCSK9 (38)	(Sp)- uu <u>scu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	294
PCSK9 (38)	(Rp)- u <u>s</u> u <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	295
PCSK9 (40)	(Sp)- u <u>s</u> u <u>cu</u> AGAccuG <u>uuuu</u> GcuudTdT	296

NOTA: las minúsculas representan restos de ARN 2'-OMe; las mayúsculas representan restos de ARN; d = restos 2'-desoxi; y "s" indica un resto fosforioato.

Los ejemplos de síntesis para cadenas no codificantes de ARNip de PCSK9 humano que tienen varios enlaces internucleotídicos de fosforioato quirales y enlaces internucleotídicos de fosforioato quirales completos.

ES 2 917 473 T3

	<b>Cadenas no codificantes de ARNip de PCSK9 humano</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
PCSK9 (41)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	297
PCSK9 (42)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAAdTsdT	298
PCSK9 (43)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAsdTdT	299
PCSK9 (44)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAAsdTdT	300
PCSK9 (45)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAsAdTdT	301
PCSK9 (46)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGAsAdTdT	302
PCSK9 (47)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAGsAAAdTdT	303
PCSK9 (48)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAGsAAAdTdT	304
PCSK9 (49)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCuAsGAAdTdT	305
PCSK9 (50)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCuAsGAAdTdT	306
PCSK9 (51)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCusAGAAdTdT	307
PCSK9 (52)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCusAGAAdTdT	308
PCSK9 (53)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUCsuAGAAdTdT	309
PCSK9 (54)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUCsuAGAAdTdT	310
PCSK9 (55)	(Rp)- AAGcAAAACAGGUsCuAGAAdTdT	311
PCSK9 (56)	(Sp)- AAGcAAAACAGGUsCuAGAAdTdT	312
PCSK9 (57)	(Rp)- AAGcAAAACAGGsUCuAGAAdTdT	313
PCSK9 (58)	(Sp)- AAGcAAAACAGGsUCuAGAAdTdT	314
PCSK9 (59)	(Rp)- AAGcAAAACAGsGUCuAGAAdTdT	315
PCSK9 (60)	(Sp)- AAGcAAAACAGsGUCuAGAAdTdT	316
PCSK9 (61)	(Rp)- AAGcAAAACAsGGUCuAGAAdTdT	317
PCSK9 (62)	(Sp)- AAGcAAAACAsGGUCuAGAAdTdT	318
PCSK9 (63)	(Rp)- AAGcAAAACsAGGUCuAGAAdTdT	319
PCSK9 (64)	(Sp)- AAGcAAAACsAGGUCuAGAAdTdT	320
PCSK9 (65)	(Rp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAdTdT	321
PCSK9 (66)	(Sp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAdTdT	322
PCSK9 (67)	(Rp)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAdTdT	323
PCSK9 (68)	(Sp)- AAGcAAAsAcAGGUCuAGAAdTdT	324
PCSK9 (69)	(Rp)- AAGcAAAsAAcAGGUCuAGAAdTdT	325
PCSK9 (70)	(Sp)- AAGcAAAsAAcAGGUCuAGAAdTdT	326
PCSK9 (71)	(Rp)- AAGcAsAAAACAGGUCuAGAAdTdT	327
PCSK9 (72)	(Sp)- AAGcAsAAAACAGGUCuAGAAdTdT	328
PCSK9 (73)	(Rp)- AAGcsAAAACAGGUCuAGAAdTdT	329
PCSK9 (74)	(Sp)- AAGcsAAAACAGGUCuAGAAdTdT	330
PCSK9 (75)	(Rp)- AAGscAAAACAGGUCuAGAAdTdT	331
PCSK9 (76)	(Sp)- AAGscAAAACAGGUCuAGAAdTdT	332
PCSK9 (77)	(Rp)- AAsGcAAAACAGGUCuAGAAdTdT	333
PCSK9 (78)	(Sp)- AAsGcAAAACAGGUCuAGAAdTdT	334
PCSK9 (77)	(Rp)- AsAGcAAAACAGGUCuAGAAdTdT	335
PCSK9 (78)	(Sp)- AsAGcAAAACAGGUCuAGAAdTdT	336

ES 2 917 473 T3

	<b>Cadenas no codificantes de ARNip de PCSK9 humano</b>	<b>SEQ ID NO:</b>
PCSK9 (79)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAsdTsdT	337
PCSK9 (80)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAAsdTsdT	338
PCSK9 (81)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAsAdTsdT	339
PCSK9 (82)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGAsAdTsdT	340
PCSK9 (83)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGsAAAdTsdT	341
PCSK9 (84)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAGsAAAdTsdT	342
PCSK9 (85)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAsGAAAdTsdT	343
PCSK9 (86)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCuAsGAAAdTsdT	344
PCSK9 (87)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCusAGAAAdTsdT	345
PCSK9 (88)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCusAGAAAdTsdT	346
PCSK9 (89)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCsuAGAAAdTsdT	347
PCSK9 (90)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUCsuAGAAAdTsdT	348
PCSK9 (91)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUsCuAGAAAdTsdT	349
PCSK9 (92)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGUsCuAGAAAdTsdT	350
PCSK9 (93)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGGsUCuAGAAAdTsdT	351
PCSK9 (94)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGGsUCuAGAAAdTsdT	352
PCSK9 (95)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAGsGUCuAGAAAdTsdT	353
PCSK9 (96)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAGsGUCuAGAAAdTsdT	354
PCSK9 (97)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcAsGGUCuAGAAAdTsdT	355
PCSK9 (98)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcAsGGUCuAGAAAdTsdT	356
PCSK9 (99)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAcsAGGUCuAGAAAdTsdT	357
PCSK9 (100)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAcsAGGUCuAGAAAdTsdT	358
PCSK9 (101)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAAdTsdT	359
PCSK9 (102)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAscAGGUCuAGAAAdTsdT	360
PCSK9 (103)	(Rp, Sp)- AAGcAAAAsAcAGGUCuAGAAAdTsdT	361
PCSK9 (104)	(Sp, Sp)- AAGcAAAAsAcAGGUCuAGAAAdTsdT	362
PCSK9 (105)	(Rp, Sp)- AAGcAAAsAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	363
PCSK9 (106)	(Sp, Sp)- AAGcAAAsAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	364
PCSK9 (107)	(Rp, Sp)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	365
PCSK9 (108)	(Sp, Sp)- AAGcAsAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	366
PCSK9 (109)	(Rp, Sp)- AAGcsAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	367
PCSK9 (110)	(Sp, Sp)- AAGcsAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	368
PCSK9 (111)	(Rp, Sp)- AAGscAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	369
PCSK9 (112)	(Sp, Sp)- AAGscAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	370
PCSK9 (113)	(Rp, Sp)- AAsGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	371
PCSK9 (114)	(Sp, Sp)- AAsGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	372
PCSK9 (115)	(Rp, Sp)- AsAGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	373
PCSK9 (116)	(Sp, Sp)- AsAGcAAAAcAGGUCuAGAAAdTsdT	374

	Cadenas no codificantes de ARNip de PCSK9 humano	SEQ ID NO:
PCSK9 (117)	(Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp)- AsAsGscAsAAsAscsAGGUCuAGAsAsdTsdT	375
PCSK9 (118)	(Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Rp, Sp, Sp)- AsAsGscAsAAsAscsAGGUCuAGAsAsdTsdT	376

NOTA: las minúsculas representan restos de ARN 2'-OMe; las mayúsculas representan restos de ARN; d = restos 2'-desoxi; y "s" indica un resto fosforotioato.

### Ejemplo 3. Análogos antisentido de FOXO-1 estereopuro.

#### Diseño racional - Composiciones de oligonucleótidos antisentido quiralmemente controlados

5 La estabilidad de nucleasas sin precedentes determinada *in vivo* y en un modelo de homogeneizado de hígado completo de rata del enlace internucleotídico de fosforotioato quiral Sp se aplica en el novedoso diseño de nuevos tipos de gámperos de sustratos de RNasaH, por el cual los flancos externos están compuestos de ADN no modificado y el número de huecos internos se modifica con modificaciones químicas en 2' (2'OMe, 2'MOE, 2'LNA, 2'F, etc.). Con el tiempo, este diseño se extiende a oligonucleótidos terapéuticos de ADN completamente sin modificar, en donde el cuidadoso control quiral del esqueleto de fosforotioato confiere las propiedades farmacológicas deseadas del oligonucleótido terapéutico de RNasaH.

15 También se ha empleado la aplicación del motivo de repetición de fosfato triplete diseñado después de estudiar la estructura cristalina de RNasaH humana. Se ha publicado previamente la estructura cristalina de RNasaH (Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid: Insight into HIV Reverse Transcription, Nowotny et al., Molecular Cell, Volumen 28, Edición 2, 264-276, 2007, archivo pdb: 2qkb). Entre otras cosas, la presente invención reconoce la importancia de la estereoquímica del enlace internucleotídico de oligonucleótidos, por ejemplo, en las configuraciones en el presente documento. Tras la realización del análisis informático en esta estructura usando el programa Pymol, el solicitante encontró que el sitio de unión a fosfato de RNasa H1 hace contactos polares con tres fosfatos contiguos del ADN complejoado, e interactúa preferencialmente con los átomos de oxígeno respectivos de Pro-R/Pro-R/Pro-S (o con Pro-S/Pro-S/Pro-R) de cada uno de estos tres fosfatos. Basándose en esta observación, los presentes inventores diseñaron dos arquitecturas quirales con motivos de fosforotioatos de repetición (RRS) y triplete (SSR) como sustratos de RNasa H diseñados. El solicitante también diseñó otros patrones estereoquímicos de enlace internucleotídico. Como se demuestra por los resultados a modo de ejemplo proporcionados en el presente documento, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas de tipos de oligonucleótidos que comprenden ciertos patrones de enlace internucleotídico de esqueleto (patrones de centros quirales del esqueleto) proporcionan actividad y/o cinética significativamente elevadas. Entre otros, una secuencia de centros quirales del esqueleto 5'-RSS-3' es particularmente útil y proporciona resultados inesperados como se describe en la presente divulgación.

35 También se utiliza en los novedosos diseños la combinación de elevado esqueleto quiral de Sp (para estabilidad enzimática y otras propiedades farmacológicamente ventajosas) y los motivos de esqueleto quiral triple y de repetición (RRS) o (SSR) (para potenciar la propiedad como sustrato de RNasa H); "S" representa enlace fosforotioato Sp y "R" representa enlace fosforotioato Rp.

Otro diseño alternativo se basa en el aumento de la cantidad de esqueleto de fosforotioato quiral Sp en motivos de repetición extendidos, tales como:

40 (SSSR)<sub>n</sub>, SR(SSSR)<sub>n</sub>, SSR(SSSR)<sub>n</sub>, SSR(SSSR)<sub>n</sub>;

(SSSSR)<sub>n</sub>, SR(SSSSR)<sub>n</sub>, SSR(SSSSR)<sub>n</sub>, SSR(SSSSR)<sub>n</sub>, SSSR(SSSSR)<sub>n</sub>;

45 (SSSSSR)<sub>n</sub>; SR(SSSSSR)<sub>n</sub>, SSR(SSSSSR)<sub>n</sub>, SSR(SSSSSR)<sub>n</sub>, SSSR(SSSSSR)<sub>n</sub>, SSSSR(SSSSSR)<sub>n</sub>; etc., donde n = 0-50, dependiendo del número de enlaces internucleotídicos respectivos; "S" representa enlace fosforotioato Sp y "R" representa enlace fosforotioato Rp. En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, R es 1-50. En algunas realizaciones, R es 1. En algunas realizaciones, un patrón común de



centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende un motivo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, un motivo está en la región de núcleo. En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, R es 1-50. En algunas realizaciones, R es 1. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4. En algunas realizaciones, n es 5.

Otro diseño alternativo se basa en el diseño de arquitectura "invertida" del estereoesqueleto ("estereoinvertmeros"). Estos resultan del posicionamiento de la estereoquímica del fosforotioato quiral en un modo de inversión, exponiendo algunos motivos ricos en Sp en los extremos 5' y 3' del oligonucleótido, así como la porción central del oligonucleótido y que tiene los motivos de estereoquímica de repetición situados en un modo de imagen invertida en ambos lados, tales como:

SS(SSR)n(SSS)(RSS)nSS;

SS(SSR)n(SRS)(RSS)nSS;

SS(SSR)n(SSR)(RSS)nSS;

SS(SSR)n(RSS)(RSS)nSS;

SS(RSS)n(SSS)(SSR)nSS;

SS(RSS)n(SRS)(SSR)nSS;

SS(RSS)n(SSR)(SSR)nSS;

SS(RSS)n(RSS)(SSR)nSS; etc.,

donde n = 0-50, dependiendo del número de enlaces internucleotídicos respectivos; "S" representa enlace fosforotioato Sp y "R" representa enlace fosforotioato Rp. En algunas realizaciones, un patrón común de centros quirales del esqueleto de una composición de oligonucleótidos quiralmente controlados proporcionada comprende un motivo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, un motivo está en la región de núcleo. En algunas realizaciones, n es 0. En algunas realizaciones, n es 1. En algunas realizaciones, n es 1-50. En algunas realizaciones, n es 2. En algunas realizaciones, n es 3. En algunas realizaciones, n es 4. En algunas realizaciones, n es 5.

**Cribado inicial**

**Síntesis: Resumen de la síntesis de oligonucleótidos en un sintetizador de ADN/ARN MerMade-12 (ciclo de 2'-desoxi y 2'-OMe)**

etapa	reacción	reactivo	volumen de administración (ml)	tiempo de espera (s)
1	destritilación	3 % de TCA en DCM	4x1	N. A.
2	acoplamiento	fosforamidito 0,15 M en ACN + ETT 0,45 M en ACN	2x0,5 ml	60 + 60 (ADN), 300 + 300 (ARN de 2'-OMe)
3	terminación	5 % de Pac <sub>2</sub> O en THF/2,6-lutidina + 16 % de NMI en THF	1	60
4	oxidación	0,02 Yodo en agua/piridina	1	240

**Oligonucleótidos PS estereoaleatorios que tienen diseño ADN-2'-OMe-ADN (7-6-7):**

ONT-141	d(CsCsCsTsCsTsGs)gsaststsgsasd(GsCsAsTsCsCsA)	(SEQ ID NO: 377)
ONT-142	d(AsAsGsCsTsTsTs)gsgststsgsgsd(GsCsAsAsCsAsC)	(SEQ ID NO: 378)
ONT-143	d(AsGsTsCsAsCsTs)tsrgsgsgsagsd(CsTsTsCsTsCsC)	(SEQ ID NO: 379)
ONT-144	d(CsAsCsTsTsGsGs)gsasgscststsd(CsTsCsCsTsGsG)	(SEQ ID NO: 380)
ONT-145	d(AsTsAsGsCsCsAs)tsstgscsagsd(CsTsGsCsTsCsA)	(SEQ ID NO: 381)
ONT-146	d(TsGsGsAsTsTsGs)asgscsastscsd(CsAsCsCsAsAsG)	(SEQ ID NO: 382)
ONT-147	d(CsCsAsTsAsGsCs)csaststsgscsd(AsGsCsTsGsCsT)	(SEQ ID NO: 383)

## ES 2 917 473 T3

ONT-148	d(GsTsCsAsCsTsTs)gsgsgsasgscsd(TsTsCsTsCsCsT)	(SEQ ID NO: 384)
ONT-149	d(CsCsAsGsGsGsCs)ascstscsastsd(CsTsGsCsAsTsG)	(SEQ ID NO: 385)
ONT-150	d(GsCsCsAsTsCsCs)asasgstscsasd(CsTsTsGsGsGsA)	(SEQ ID NO: 386)
ONT-151	d(GsAsAsGsCsTsTs)tsfgststsgsd(GsGsCsAsAsCsA)	(SEQ ID NO: 387)
ONT-152	d(CsTsGsGsAsTsTs)gsasgscsastsd(CsCsAsCsCsAsA)	(SEQ ID NO: 388)
ONT-183	d(CsAsAsGsTsCsAs)cststsgsgsgsd(AsGsCsTsTsCsT)	(SEQ ID NO: 389)
ONT-184	d(AsTsGsCsCsAsTs)cscsasasgstsd(CsAsCsTsTsGsG)	(SEQ ID NO: 390)
ONT-185	d(AsTsGsAsGsAsTs)gscscstsgsgsd(CsTsGsCsCsAsT)	(SEQ ID NO: 391)
ONT-186	d(TsTsGsGsGsAsGs)cststscstscsd(CsTsGsGsTsGsG)	(SEQ ID NO: 392)
ONT-187	d(TsGsGsGsAsGsCs)ststscstscsd(TsGsGsTsGsGsA)	(SEQ ID NO: 393)
ONT-188	d(TsTsAsTsGsAsGs)astsgscscstsd(GsGsCsTsGsCsC)	(SEQ ID NO: 394)
ONT-189	d(GsTsTsAsTsGsAs)gsastsgscscsd(TsGsGsCsTsGsC)	(SEQ ID NO: 395)
ONT-190	d(CsCsAsAsGsTsCs)ascststsgsgsd(GsAsGsCsTsTsC)	(SEQ ID NO: 396)
ONT-191	d(AsGsCsTsTsTsGs)gststsgsgsgsd(CsAsAsCsAsCsA)	(SEQ ID NO: 397)
ONT-192	d(TsAsTsGsAsGsAs)tsfgscscstsgsd(GsCsTsGsCsCsA)	(SEQ ID NO: 398)
ONT-193	d(TsGsTsTsAsTsGs)asgsastsgscsd(CsTsGsGsCsTsG)	(SEQ ID NO: 399)
ONT-194	d(AsTsCsCsAsAsGs)tsacsascstsd(GsGsGsAsGsCsT)	(SEQ ID NO: 400)
ONT-195	d(GsGsGsAsAsGsCs)stststsgsgsd(TsGsGsGsCsAsA)	(SEQ ID NO: 401)
ONT-196	d(CsTsCsCsAsTsCs)csastsgsasgsd(GsTsCsAsTsTsC)	(SEQ ID NO: 402)
ONT-197	d(AsAsGsTsCsAsCs)ststsgsgsgsd(GsCsTsTsCsTsC)	(SEQ ID NO: 403)
ONT-198	d(CsCsAsTsCsCsAs)asgstscsascsd(TsTsGsGsGsAsG)	(SEQ ID NO: 404)
ONT-199	d(TsCsCsAsAsGsTs)csascststsgsd(GsGsAsGsCsTsT)	(SEQ ID NO: 405)
ONT-200	d(CsCsTsCsTsGsGs)aststsgsasgsd(CsAsTsCsCsAsC)	(SEQ ID NO: 406)
ONT-201	d(AsCsTsTsGsGsGs)asgscststscsd(TsCsCsTsGsGsT)	(SEQ ID NO: 407)
ONT-202	d(CsTsTsGsGsGsAs)gscststscstsd(CsCsTsGsGsTsG)	(SEQ ID NO: 408)
ONT-203	d(CsAsTsGsCsCsAs)tsccscsasasgsd(TsCsAsCsTsTsG)	(SEQ ID NO: 409)
ONT-204	d(TsGsCsCsAsTsCs)csasasgstscsd(AsCsTsTsGsGsG)	(SEQ ID NO: 410)
ONT-205	d(TsCsCsAsTsCsCs)astsgsasgsd(TsCsAsTsTsCsC)	(SEQ ID NO: 411)
ONT-206	d(AsGsGsGsCsAsCs)tsacsastscstsd(GsCsAsTsGsGsG)	(SEQ ID NO: 412)
ONT-207	d(CsCsAsGsTsTsCs)cststscsastsd(TsCsTsGsCsAsC)	(SEQ ID NO: 413)
ONT-208	d(CsAsTsAsGsCsCs)aststsgscsasd(GsCsTsGsCsTsC)	(SEQ ID NO: 414)
ONT-209	d(TsCsTsGsGsAsTs)tsfgsasgscsasd(TsCsCsAsCsCsA)	(SEQ ID NO: 415)
ONT-210	d(GsGsAsTsTsGsAs)gscsastscscsd(AsCsCsAsAsGsA)	(SEQ ID NO: 416)

**Datos *in vitro* de biología en células HepG2 para el diseño inicial ADN-2'-OMe-ADN (7-6-7): (d Mayúsculas) = ADN; minúsculas = 2'-OMe; s = fosforotioato.**

5

FOXO1

	Niveles a 20 nM (%)	DE
ONT-141	89	6
ONT-142	45	1
ONT-143	98	2
ONT-144	89	1
ONT-145	46	5
ONT-146	99	1
ONT-147	66	6
ONT-148	101	2

## ES 2 917 473 T3

Niveles a 20 nM (%)		DE
ONT-149	95	6
ONT-150	58	4
ONT-151	41	5
ONT-152	84	5
ONT-183	95	2
ONT-184	58	4
ONT-185	42	2
ONT-186	96	4
ONT-187	92	3
ONT-188	47	5
ONT-189	63	5
ONT-190	83	2
ONT-191	58	4
ONT-192	46	2
ONT-193	58	2
ONT-194	76	1
ONT-195	66	0
ONT-196	77	2
ONT-197	90	6
ONT-198	42	4
ONT-199	68	1
ONT-200	89	6
ONT-201	91	2
ONT-202	94	2
ONT-203	86	1
ONT-204	58	2
ONT-205	75	3
ONT-206	94	5
ONT-207	96	0
ONT-208	54	0
ONT-209	87	4
ONT-210	92	4

FOXO1

Niveles a 200 nM (%)		DE
ONT-141	37	4
ONT-142	45	4
ONT-143	46	2
ONT-144	42	5
ONT-145	53	4
ONT-146	31	2
ONT-147	28	8
ONT-148	45	4
ONT-149	29	5
ONT-150	32	6

Niveles a 200 nM (%)		DE
ONT-151	38	4
ONT-152	30	5
ONT-183	60	5
ONT-184	34	2
ONT-185	50	2
ONT-186	86	3
ONT-187	76	6
ONT-188	50	5
ONT-189	38	2
ONT-190	51	1
ONT-191	43	5
ONT-192	54	7
ONT-193	41	6
ONT-194	50	1
ONT-195	43	6
ONT-196	33	7
ONT-197	57	4
ONT-198	40	5
ONT-199	50	5
ONT-200	28	9
ONT-201	46	6
ONT-202	57	9
ONT-203	27	7
ONT-204	36	6
ONT-205	29	5
ONT-206	81	0
ONT-207	37	4
ONT-208	43	3
ONT-209	35	4
ONT-210	40	4

**Oligonucleótidos PS estereoaleatorios que tienen diseño 2'-OMe-ADN-2'OMe (3-14-3): (d Mayúsculas) = ADN; minúsculas = 2'-OMe; s = fosforotioato.**

5

ONT-129	cscscsd(TsCsTsGsGsAsTsTsGsAsGsCsAsTs)cscsa	(SEQ ID NO: 417)
ONT-130	asasgsd(CsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAs)csasc	(SEQ ID NO: 418)
ONT-131	asgstsd(CsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTsTsCs)tspsc	(SEQ ID NO: 419)
ONT-132	csascsd(TsTsGsGsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCs)tsqsg	(SEQ ID NO: 420)
ONT-133	astcsd(GsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCs)tscca	(SEQ ID NO: 421)
ONT-134	tsqsgsd(AsTsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAsCsCs)asasg	(SEQ ID NO: 422)
ONT-135	cscscsd(TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTs)gscst	(SEQ ID NO: 423)
ONT-136	gstcsd(AsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTsTsCsTs)cscst	(SEQ ID NO: 424)
ONT-137	cscscsd(GsGsGsCsAsCsTsCsAsTsCsTsGsCs)astsg	(SEQ ID NO: 425)
ONT-138	gscscsd(AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGs)gsgsa	(SEQ ID NO: 426)

## ES 2 917 473 T3

ONT-139	gsasasd(GsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAs)ascsa	(SEQ ID NO: 427)
ONT-140	ctstgsd(GsAsTsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAsCs)csasa	(SEQ ID NO: 428)
ONT-155	csasasd(GsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTs)tsctst	(SEQ ID NO: 429)
ONT-156	astsgsd(CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTs)tsqsg	(SEQ ID NO: 430)
ONT-157	astsgsd(AsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCs)csast	(SEQ ID NO: 431)
ONT-158	tsstgsd(GsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTsGsGs)tsqsg	(SEQ ID NO: 432)
ONT-159	tsqsgsd(GsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTsGsGsTs)gsgsa	(SEQ ID NO: 433)
ONT-160	tsstasd(TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTs)gscsc	(SEQ ID NO: 434)
ONT-161	gststsd(AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCs)tsqsc	(SEQ ID NO: 435)
ONT-162	cscsasd(AsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCs)tsstc	(SEQ ID NO: 436)
ONT-163	asgscsd(TsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCs)ascsa	(SEQ ID NO: 437)
ONT-164	tsastsd(GsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGs)csaca	(SEQ ID NO: 438)
ONT-165	tsqstsd(TsAsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGs)csstg	(SEQ ID NO: 439)
ONT-166	astscsd(CsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAs)gscst	(SEQ ID NO: 440)
ONT-167	gsgsgsd(AsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGs)csasa(SEQ	ID NO: 441)
ONT-168	ctstcsd(CsAsTsCsCsAsTsGsAsGsGsTsCsAs)tsstc	(SEQ ID NO: 442)
ONT-169	asasgsd(TsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGsCsTsTs)ctstc	(SEQ ID NO: 443)
ONT-170	cscsasd(TsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGs)gsasg	(SEQ ID NO: 444)
ONT-171	tsccsd(AsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsGs)csstt	(SEQ ID NO: 445)
ONT-172	cscstsd(CsTsGsGsAsTsTsGsAsGsCsAsTsCs)csasc	(SEQ ID NO: 446)
ONT-173	ascstsd(TsGsGsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTs)gsgst	(SEQ ID NO: 447)
ONT-174	csstsd(GsGsGsAsGsCsTsTsCsTsCsCsTsGs)gstsg	(SEQ ID NO: 448)
ONT-175	csastsd(GsCsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCs)tsstg	(SEQ ID NO: 449)
ONT-176	tsqscsd(CsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTs)gsgsg	(SEQ ID NO: 450)
ONT-177	tsccsd(AsTsCsCsAsTsGsAsGsGsTsCsAsTs)tscc	(SEQ ID NO: 451)
ONT-178	asgsgsd(GsCsAsCsTsCsAsTsCsTsGsCsAsTs)gsgsg	(SEQ ID NO: 452)
ONT-179	cscsasd(GsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTsGs)csasc	(SEQ ID NO: 453)
ONT-180	csastsd(AsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGs)csstc	(SEQ ID NO: 454)
ONT-181	tsctsd(GsGsAsTsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAs)csaca	(SEQ ID NO: 455)
ONT-182	gsgasd(TsTsGsAsGsCsAsTsCsCsAsCsCsAs)asgsa(SEQ	ID NO: 456)

**Datos *in vitro* de biología en células HepG2 para el diseño 2'-OMe-ADN-2'-OMe (3-14-3):**

5 FOXO1

	Niveles a 20 nM (%)	DE
ONT-129	82	5
ONT-130	49	4
ONT-131	92	3
ONT-132	91	2
ONT-133	58	3
ONT-134	73	2
ONT-135	65	5
ONT-136	92	2
ONT-137	94	2
ONT-138	78	1
ONT-139	61	1

## ES 2 917 473 T3

Niveles a 20 nM (%)		DE
ONT-140	82	4
ONT-155	95	2
ONT-156	74	1
ONT-157	56	2
ONT-158	93	1
ONT-159	94	1
ONT-160	71	1
ONT-161	67	1
ONT-162	89	1
ONT-163	55	7
ONT-164	68	4
ONT-165	70	1
ONT-166	89	4
ONT-167	81	0
ONT-168	81	0
ONT-169	94	0
ONT-170	88	1
ONT-171	92	4
ONT-172	86	2
ONT-173	90	1
ONT-174	93	2
ONT-175	84	1
ONT-176	80	2
ONT-177	83	2
ONT-178	95	2
ONT-179	93	8
ONT-180	68	7
ONT-181	85	5
ONT-182	80	5

FOXO1

Niveles a 200 nM (%)		DE
ONT-129	27	1
ONT-130	46	4
ONT-131	53	9
ONT-132	53	2
ONT-133	48	6
ONT-134	35	9
ONT-135	45	15
ONT-136	40	7
ONT-137	50	4
ONT-138	80	3
ONT-139	40	3
ONT-140	33	13
ONT-155	52	2

## ES 2 917 473 T3

Niveles a 200 nM (%)		DE
ONT-156	35	4
ONT-157	39	2
ONT-158	87	6
ONT-159	89	5
ONT-160	33	10
ONT-161	40	11
ONT-162	60	7
ONT-163	42	8
ONT-164	34	10
ONT-165	38	1
ONT-166	62	9
ONT-167	64	1
ONT-168	38	2
ONT-169	67	3
ONT-170	74	8
ONT-171	65	5
ONT-172	33	18
ONT-173	72	15
ONT-174	65	15
ONT-175	38	21
ONT-176	48	8
ONT-177	28	5
ONT-178	97	11
ONT-179	47	6
ONT-180	56	12
ONT-181	45	26
ONT-182	33	17

### Selección de resultados positivos:

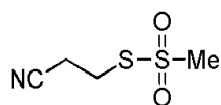
5

ONT-151	d(GsAsAsGsCsTsTs)tsgsgststsgsd(GsGsCsAsAsCsA)	(SEQ ID NO: 457)
ONT-198	d(CsCsAsTsCsCsAs)asgstscsascsd(TsTsGsGsGsAsG)	(SEQ ID NO: 458)
ONT-185	d(AsTsGsAsGsAsTs)gscscstsgsgsd(CsTsGsCsCsAsT)	(SEQ ID NO: 459)
ONT-142	d(AsAsGsCsTsTsTs)gsgststsgsgsd(GsCsAsAsCsAsC)	(SEQ ID NO: 460)
ONT-145	d(AsTsAsGsCsCsAs)tsstgscsasgsd(CsTsGsCsTsCsA)	(SEQ ID NO: 461)
ONT-192	d(TsAsTsGsAsGsAs)tsstgscscstsgsd(GsCsTsGsCsCsA)	(SEQ ID NO: 462)
ONT-188	d(TsTsAsTsGsAsGs)aststgscscstsd(GsGsCsTsGsCsC)	(SEQ ID NO: 463)

### Cribado secundario. Cribado de química y estereoquímica

10 **Resumen de la síntesis de oligonucleótidos en un sintetizador de ADN/ARN MerMade-12 (ciclo de 2'-desoxi y 2'-OMe de fosforotioato estereodefinido)**

etapa	reacción	reactivo	vol. de administración(ml)	tiempo de espera (s)
1	destritilación	3 % de TCA en DCM	4x1	N. A.
2	acoplamiento	fosforamidito quirral 0,15 M en ACN + CMPT 2 M en ACN	2x0,5	2 x 450 ARN de (2'-OMe) 2 x 300 (ADN)
3	terminación 1	5 % de Pac <sub>2</sub> O en THF/2,6-lutidina	1	60
4	terminación 2	5 % de Pac <sub>2</sub> O en THF/2,6-lutidina + 16 % de NMI en THF	1	60
5	sulfurización	S-(2-cianoetil)metiltiosulfonato 0,3 M	1	600



en ACN/BSTFA

**Ejemplos aplicados en las secuencias de resultado positivo de FOXO1 (cubiertas por las reivindicaciones):**

Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a:

5

(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp,  
Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 464)  
(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 465)  
(Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp,  
Sp)d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA] (SEQ ID NO: 466)



(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp,  
 Sp)d[C*sCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG*] (SEQ ID NO: 467)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[C*sCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG*] (SEQ ID NO: 468)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)  
 d[G*sAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA*] (SEQ ID NO: 469)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 470)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 471)  
 (Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 472)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 473)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Rp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp)  
 d[G*sAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA*] (SEQ ID NO: 474)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[C*sCsAsTsCsCsAs*](A*sGsTsCsAsCs*)<sub>OMe</sub>d[T*sTsGsGsGsAsG*] (SEQ ID NO: 475)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTs*](G*sCsCsTsGsGs*)<sub>OMe</sub>d[C*sTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 476)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[C*sCsAsTsCsCsAs*](A*sGsTsCsAsCs*)<sub>LNA</sub>d[T*sTsGsGsGsAsG*] (SEQ ID NO: 477)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTs*](G*sCsCsTsGsGs*)<sub>LNA</sub>d[C*sTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 478)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[C*sCsAsTsCsCsAs*](A*sGsTsCsAsCs*)<sub>MOE</sub>d[T*sTsGsGsGsAsG*] (SEQ ID NO: 479)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[A*sTsGsAsGsAsTs*](G*sCsCsTsGsGs*)<sub>MOE</sub>d[C*sTsGsCsCsAsT*] (SEQ ID NO: 480)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)(C*sCsAs*)<sub>OMe</sub>d[T*sCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGs*](G*sAsG*)<sub>OMe</sub> (SEQ ID NO: 481)

(Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)(AsTsGs)<sub>MOEd</sub>[AsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCs](CsAsT)<sub>MOE</sub> (SEQ ID NO: 482)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)(CsCsAs)<sub>LNA</sub>d[TsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGs](GsAsG)<sub>LNA</sub> (SEQ ID NO: 483)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)(AsTsGs)<sub>OMe</sub>d[AsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCs](CsAsT)<sub>OMe</sub> (SEQ ID NO: 484)  
 (Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 485)  
 (Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp,  
 Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT] (SEQ ID NO: 486)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)  
 d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA] (SEQ ID NO: 487)  
 (Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp,  
 Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT] (SEQ ID NO: 488)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT] (SEQ ID NO: 490)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp)  
 d[GsAsAsGsCsTsTsTsGsGsTsTsGsGsGsCsAsAsCsA] (SEQ ID NO: 491)  
 (Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT] (SEQ ID NO: 492)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 493)  
 (Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 494)  
 (Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[AsTsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsT] (SEQ ID NO: 495)  
 (Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 496)

(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 497)

(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 498)

(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 499)

(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 500)

(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)d[CsCsAsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGsAsG] (SEQ ID NO: 501)

(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp,  
 Sp)(CsCs)<sub>OME</sub>d[AsTsCsCsAsAs](GsTsCs)<sub>OME</sub>d[AsCsTsTsGsGsGs](AsG)<sub>OME</sub> (SEQ ID NO: 502)

(Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp)  
 (CsCs)<sub>LNA</sub>d[AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs](AsG)<sub>LNA</sub> (SEQ ID NO: 503)

(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)  
 (CsCs)<sub>MOE</sub>d[AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs](AsG)<sub>MOE</sub> (SEQ ID NO: 504)

(Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp, Rp, Sp, Sp)  
 (CsCs)<sub>OME</sub>d[AsTsCsCsAsAsGsTsCsAsCsTsTsGsGsGs](AsG)<sub>OME</sub> (SEQ ID NO: 505)

#### **Ejemplo 4. Supresión de polímero de ácido nucleico**

- 5 Entre otras cosas, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y métodos de los mismos que dan resultados inesperados cuando se usan, por ejemplo, para suprimir polímeros de ácido nucleico mediante, en algunos casos, la escisión de dichos polímeros de ácido nucleico. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, los presentados en el presente documento.
- 10 **Ensayo de RNasa H**
- 15 La tasa de escisión de los polímeros de ácido nucleico por nucleasas, por ejemplo, ARN por RNasa H, es importante con respecto al uso de los oligonucleótidos en tecnologías terapéuticas, tales como la tecnología antisentido. Usando el ensayo de los presentes inventores, investigaron las tasas de escisión y analizaron los metabolitos para composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados de tipos de oligonucleótidos particulares (P-diaestereómeros) cuando los oligonucleótidos de los tipos de oligonucleótidos particulares se unen a ARN complementario. Los resultados a continuación también ilustran la importancia de los patrones de escisión reconocidos por la presente invención.
- 20 La RNasa H usada en el presente documento es una endonucleasa ubicuamente expresada que hidroliza la cadena de ARN de un híbrido de ARN/ADN. Desempeña una función importante en el modo de acción de los oligonucleótidos antisentido. En algunas realizaciones, la tasa de escisión de RNasa H se reduce significativamente cuando el sustrato de ARN está estructurado (Lima, W. F., Venkatraman, M., Crooke, S.T. The Influence of Antisense Oligonucleotide-induced RNA Structure on Escherichia coli RNase H1 Activity The Journal Of Biological Chemistry 272, No. 29, 18191-25 18199, (1997)). Además, los diseños de gápmers de 2'-MOE (5-10-5) ofrecen mayores afinidades por dianas de ARN que conducen a una renovación mínima de la cadena no codificante. La presencia de modificaciones de 2'-MOE en las alas también reduce el número de sitios de escisión de RNasa H.
- 30 Para estudiar la tasa de escisión de ARN, la presente invención proporciona un simple ensayo para cuantificar la longitud de ARN que queda después de la incubación con RNasa H. El método proporcionado proporciona, entre otras cosas, las tasas relativas de escisión de RNasa H para gápmers modificados en 2' estereoaleatorios, composiciones de oligonucleótidos de ADN estereoaleatorias y P-diaestereómeros quiralmemente puros (composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados de un tipo de oligonucleótido correspondiente) para diversos oligómeros para diferentes dianas. El cambiar la estereoquímica en regiones modificadas en 2' y el núcleo de ADN proporciona información con respecto a cómo la estereoquímica en estas regiones afecta la interacción de RNasa H con sus 35 sustratos. Se analizaron por CL/EM las mezclas de reacción de RNasa H en diferentes momentos de tiempo para determinar el patrón de escisión. La presente invención proporciona, entre otras cosas, tasas de escisión y patrones

de escisión (mapas) de polímeros de ácido nucleico, por ejemplo ARN, que son críticos para el diseño de arquitecturas de ácido nucleico estereoquímico para una actividad óptima, por ejemplo, actividad antisentido.

#### Equipo:

Alliance HPLC, 2489 - TUV, 2695E - Equipado con inyector automático

Cary100 (Agilent Technologies)

#### Métodos:

**Preparación de dúplex de ADN/ARN:** Se determinaron concentraciones de oligonucleótidos midiendo la absorbancia en agua a 260 nm. Se prepararon dúplex de ADN/ARN mezclando disoluciones equimolares de oligonucleótidos con cada concentración de cadena de 10  $\mu$ M. Las mezclas se calentaron a 90 °C durante 2 minutos en un baño de agua y se enfriaron lentamente durante varias horas.

**Expresión de proteínas de RNasa H humana y purificación:** Se obtuvo el clon de RNasa HC humana del laboratorio del Prof. Wei Yang's en NIH Bethesda. Se ha descrito el protocolo para obtener esta RNasa HC humana (restos 136-286) (Nowotny, M. et al. Structure of Human RNase H1 Complexed with an RNA/DNA Hybrid: Insight into HIV Reverse Transcription. Molecular Cell 28, 264-276, (2007). La expresión de proteínas se llevó a cabo siguiendo el protocolo informado, con la excepción de que la proteína resultante tuvo un marca His6 aminoterminal (SEQ ID NO: 621). Se usaron células BL21(DE3) de *E. coli* en medio LB para la expresión de las proteínas. Las células se cultivaron a 37 °C hasta que DO600 llegó a aproximadamente 0,7. Entonces se enfriaron los cultivos y se añadió IPTG 0,4 mM para inducir la expresión de proteínas durante la noche a 16 °C. Se preparó extracto de *E. coli* por sonicación en tampón A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  40 mM (pH 7,0), NaCl 1 M, 5 % de glicerol,  $\beta$ -mercaptoetanol 2,8 mM e imidazol 10 mM) con la adición de inhibidores de la proteasa (Sigma-Aldrich). El extracto se purificó por columna de afinidad de Ni usando tampón A más imidazol 60 mM. La proteína se eluyó con un gradiente lineal de imidazol 60 a 300 mM. Se recogió el pico de proteína y se purificó más en una columna Mono S (GE Healthcare) con un gradiente de NaCl 100 mM – 500 mM en tampón B. Las fracciones que contenían RNasa HC se concentraron a 0,3 mg/ml en el tampón de almacenamiento (HEPES 20 mM (pH 7,0), NaCl 100 mM, 5 % de glicerol, EDTA 0,5 mM, DTT 2 mM) y se guardaron a -20 °C. 0,3 mg/ml de concentración de enzima corresponde a 17,4  $\mu$ M basado en su coeficiente de extinción informado ( $32095 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) y MW (unidades de 18963,3 Da).

**Ensayo de RNasa H:** En una placa de 96 pocillos, a 25  $\mu$ l de dúplex de ADN/ARN (10  $\mu$ M) se añadió 5  $\mu$ l de 10X tampón RNasa H, seguido por 15  $\mu$ l de agua. La mezcla se incubó a 37 °C durante algunos minutos y luego se añadieron 5  $\mu$ l de disolución madre 0,1  $\mu$ M de enzima para dar un volumen total de 50  $\mu$ l con concentración final de sustrato/enzima de 5  $\mu$ M/0,01  $\mu$ M (500:1) y se incubó más a 37 °C. Se estudiaron diversas relaciones del dúplex de ADN/ARN: proteína RNasa H usando estas condiciones para encontrar una relación óptima para estudiar la cinética. Las reacciones se inactivaron en diferentes momentos de tiempo usando 10  $\mu$ l de disolución 500 mM de EDTA disódico en agua. Para el momento de tiempo cero min, se añadió EDTA a la mezcla de reacción antes de la adición de enzima. Se realizaron controles para garantizar que el EDTA fuera capaz de inhibir satisfactoriamente la actividad enzimática completamente. Después de que se inactivaron todas las reacciones, se inyectaron 10  $\mu$ l de cada mezcla de reacción a la columna analítica de HPLC (XBridge C18, 3,5  $\mu$ m, 4,6 x 150 mm, pieza de Waters N.º 186003034). Se puede medir Kcat/Km por varios métodos, tales como el ensayo de RNasa H dependiente de FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia) usando ARN marcado doble y se monitorizó por SpectraMax.

**Protocolo de extracción en fase sólida para la preparación de muestras para CL/EM:** Se usó una placa de 96 pocillos (pieza de Waters N.º 186002321) para purificar la mezcla de reacción de RNasa H antes de realizar la CL/EM. Se usaron 500  $\mu$ l de acetonitrilo, seguido por agua, para equilibrar la placa en vacío suave con la ayuda de un colector (pieza de Millipore N.º MSV MHTS00). Se tuvo precaución para no dejar que la placa se seque. Se cargó aproximadamente 50-100  $\mu$ l de mezcla de reacción de RNasa H en cada pocillo, seguido por lavados con agua (2 ml) a vacío suave. Se usó 2x500  $\mu$ l de 70 % de ACN/agua para recuperar la muestra. Las muestras recuperadas se transfirieron a tubos de centrifugadora de 2 ml y se concentraron a sequedad en SpeedVac. Cada muestra seca se reconstituyó en 100  $\mu$ l de agua y se inyectó 10  $\mu$ l en Acquity UPLC@OST C18 1,7 $\mu$ m, 2,1 x 50mm (pieza N.º 186003949) para análisis de CL/EM.

Para el análisis por espectrometría de masas, se purificaron las mezclas de reacción después de la extinción usando una placa de 96 pocillos C<sub>18</sub> (Waters). Los oligómeros se eluyeron en 70 % de acetonitrilo/agua. El acetonitrilo se evaporó usando SpeedVac y el resto resultante se reconstituyó en agua para inyección.

Eluyente A = Acetato de trietilamonio 50 mM

Eluyente B = Acetonitrilo

Temperatura de la columna = 60 °C

Se registró UV a 254 nm y 280 nm

#### Método de gradiente de RP-HPLC

5

	Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% de A	% de B	Curva
1	0,0	1,00	95,0	5,0	
2	2,00	1,00	95,0	5,0	1
3	22,00	1,00	80,0	20,0	6
4	25,00	1,00	5,0	95,0	6
5	25,5	1,00	95,0	5,0	1
6	30	1,00	95,0	5,0	1

En los cromatogramas de HPLC, se integraron las áreas de los picos correspondientes al oligómero de ARN de longitud completa (ONT-28), se normalizaron usando el pico de ADN y se representaron frente al tiempo (Figura 8). ONT-87 mostró escisión superior para ARN complementario cuando estaba en forma de dúplex, en comparación con los otros candidatos de producto y mipomersen. Puesto que todos los diaestereómeros en este panel tienen alas modificadas con 2'-MOE que no activan la enzima RNasa H, sin la intención de limitar por teoría, el solicitante observa que es probable que la actividad venga impuesta por la estereoquímica en el núcleo de ADN. Los heterodúplex con ONT-77 a ONT-81 que incluyen mipomersen en la cadena no codificante muestran tasas de escisión de ARN muy similares. ONT-89 con estereoquímica Sp/Rp alterna mostró la menor actividad en el periodo de tiempo probado, en las condiciones probadas. Entre los oligonucleótidos probados con modificaciones de MOE, las unidades de ONT-87 y ONT-88 en la cadena no codificante presentaron un aumento en la actividad en comparación con el resto de los heterodúplex. Particularmente, ONT-87 proporcionó una tasa de escisión sorprendentemente alta y un nivel inesperadamente bajo de ARN diana restante. Datos adicionales a modo de ejemplo se ilustraron en la Figura 6 y Figura 24.

**Ensayo de transfección de oligonucleótidos *in vitro*:** Los ensayos de transfección son ampliamente conocidos y son puestos en práctica por los expertos habituales en la técnica. Un protocolo a modo de ejemplo se describe en el presente documento. Se transfectaron de forma inversa células Hep3B con Lipofectamine 2000 (Life Technologies, Cat. N.º 11668-019) a  $18 \times 10^3$  células/pocillo de densidad en placas de 96 pocillos usando el protocolo del fabricante. Para las curvas de respuesta a dosis se usan ocho diluciones sucesivas de 1/3 a partir de 60-100 nM. Se mezclan 25 µl de 6x concentración de oligonucleótido con una mezcla preparada de 0,4 µl de Lipofectamine 2000 con 25 µl de medio sin suero Opti-MEM (Gibco, Cat. N.º 31985-062) por pocillo. Después de una incubación de 20 min, se añadieron 100 µl de  $180 \times 10^3$  células/ml suspendas en 10 % de FBS en medio de cultivo celular de DMEM (Gibco, Cat. N.º 11965-092) para llevar el volumen final a 150 µl por pocillo. 24-48 horas después de la transfección se lisan células Hep3B añadiendo 75 µl de mezcla de lisis con 0,5 mg/ml de proteinasa K usando el kit de procesamiento de mezclas QuantiGene para células cultivadas (Affymetrix, Cat. N.º QS0103). Se miden los niveles de expresión de ARNm diana y ARNm de GAPDH en lisados celulares usando el kit de ensayo Affymetrix QuantiGene 2.0 (Cat. N.º QS0011) según el protocolo del fabricante. La expresión de ARNm diana se normaliza con respecto a la expresión de ARNm de GAPDH de la misma muestra; y se comparan niveles relativos de diana/GAPDH con transfecciones usando control de Lipofectamine 2000 solo (sin oligonucleótido). Se generan curvas de respuesta a dosis por GraphPad Prism 6 usando el ajuste a curva del logaritmo de regresión no lineal (inhibidor) frente a la respuesta con pendiente variable (4 parámetros). Para resultados a modo de ejemplo, véase la Figura 24, la Figura 27 y la Figura 29.

#### **Ejemplo 5. Las composiciones proporcionadas y los métodos proporcionan el control de patrones de escisión**

La presente invención encontró sorprendentemente que el patrón de estereoquímica del enlace internucleotídico tiene un impacto inesperado sobre los patrones de escisión de polímeros de ácido nucleico. Cambiando los patrones comunes de centros quirales del esqueleto de las composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados, los números de sitios de escisión, el porcentaje de escisión en un sitio de escisión y/o las localizaciones de sitios de escisión pueden ser sorprendentemente alterados, tanto independientemente como en combinación. Como se describe en el ejemplo en el presente documento, las composiciones proporcionadas y los métodos pueden proporcionar control de los patrones de escisión de polímeros de ácido nucleico.

Usando condiciones de ensayo similares, se probaron diversas composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados de diferentes tipos de oligonucleótidos. Los patrones de escisión a modo de ejemplo de la secuencia de ARN diana se presenta en la Figura 9. Ciertos patrones de centros quirales del esqueleto, tales como aquellos en ONT-87 y ONT-154, producen sorprendentemente solo un sitio de escisión en la secuencia diana. Además, se encuentra sorprendentemente que los oligonucleótidos que proporcionan un único sitio de escisión, tales como ONT-

87 y ONT-154, proporcionan inesperadamente una alta tasa de escisión y un bajo nivel de polímero de ácido nucleico diana restante. Véase también la Figura 8, la Figura 10 y la Figura 11.

**Ejemplo 6. Escisión a modo de ejemplo de ARNm de FOXO1**

5 Se probaron las composiciones de oligonucleótidos que se dirigen a diferentes regiones de ARNm de FOXO1 en ensayos de escisión como se ha descrito anteriormente. En cada caso, se mostró que las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados eran capaces de proporcionar patrones de escisión alterados con respecto a los patrones de escisión de referencia de composiciones de oligonucleótidos quiralmemente no controlados que compartían la misma secuencia de bases y longitud comunes. Para resultados a modo de ejemplo, véase la Figura 10 y la Figura 11. Como se muestra en la Figura 12, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo proporcionan tanto tasas de escisión significativamente más rápidas como niveles inesperadamente bajos de sustratos restantes cuando se compara con composiciones de oligonucleótidos quiralmemente no controlados de referencia. En algunas realizaciones, como se muestra en la Figura 11, los sitios de escisión están asociados con la secuencia de centros quirales del esqueleto RpSpSp. En algunas realizaciones, los sitios de la escisión son dos pares de bases en la dirección 5' de RpSpSp.

A continuación se enumeran composiciones de oligonucleótidos a modo de ejemplo.

Oligo	Secuencia	Descripción	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-366	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	Todo ADN	66,5	506
ONT-389*	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	S <sub>7</sub> RSSRSSRS <sub>5</sub>	64,3	507
ONT-390*	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	S <sub>6</sub> RSSRSSRS <sub>6</sub>	64,6	508
ONT-391*	dTsdGsdAsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTs dGsdCsdCsdAsdTsdA	S <sub>5</sub> RSSRSSRS <sub>7</sub>	64,3	509
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA	ARN complementario		510
ONT-367	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	Todo ADN	62,9	511
ONT-392*	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	S <sub>7</sub> RSSRSSRS <sub>5</sub>	59,5	512
ONT-393*	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	S <sub>6</sub> RSSRSSRS <sub>6</sub>	60	513

Oligo	Secuencia	Descripción	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-394*	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTs dGsdCsdTsdCsdAsdC	S <sub>5</sub> RSSRSSRS <sub>7</sub>	59,5	514
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCr ArArUrGrGrCrUrA	ARN complementario		515

\* El asterisco indica que la composición de oligonucleótidos está cubierta por las reivindicaciones.

### **Ejemplo 7. Las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo proporcionan mayor renovación**

5 En los casos en los que la Tm de los fragmentos escindidos del polímero de ácido nucleico, por ejemplo fragmentos de ARN, con respecto a los oligonucleótidos es mayor que una temperatura fisiológica, se puede inhibir la disociación de productos y los oligonucleótidos pueden no ser capaces de disociarse y encontrar otras cadenas diana para formar dúplex y provocar que se escindan las cadenas diana. La Tm de ONT-316 (gápmo 5-10-5 2'-MOE) con respecto al  
10 ARN complementario es 76 °C. Después de un corte o algunos cortes en la secuencia de ARN complementaria a los oligonucleótidos, los fragmentos de 2'-MOE pueden seguir unidos a ARN y así no pueden causar que otras moléculas diana se escindan. Las temperaturas de fusión térmica de cadenas de ADN son, en general, mucho más bajas cuando se duplexan con ARN, por ejemplo, ONT-367 (63 °C) y ONT-392 (60 °C). Además, la estabilidad térmica en las  
15 secuencias de ADN está frecuentemente relativamente uniformemente distribuida en comparación con los oligonucleótidos modificados con 2'-MOE. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas no contienen modificaciones en 2', tales como 2'-MOE. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos en las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas, que no contienen modificaciones en 2', tales como 2'-MOE, se disocian más fácilmente de los  
20 fragmentos de escisión de polímeros de ácido nucleico, y tienen mayor renovación que los oligonucleótidos que tienen modificaciones en 2', tales como 2'-MOE. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona diseños de todo ADN, en los que los oligonucleótidos no tienen modificaciones en 2'. En algunas realizaciones, composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados, en donde los oligonucleótidos que no tienen modificación en 2' proporcionan mayor renovación de una nucleasa, tal como RNasa H. En algunas realizaciones, después de la escisión, la RNasa H se disocia más fácilmente del dúplex formado por ARN y oligonucleótidos de composiciones de oligonucleótidos  
25 quiralmemente controlados proporcionadas. Usando protocolos similares como se ha descrito anteriormente, la renovación de dos composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo de tipo de oligonucleótido ONT-367 y ONT-392 mostró de hecho mayor tasa de renovación que las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente no controlados de referencia (véase la Figura 13).

### **Ejemplo 8. Escisión a modo de ejemplo de ARNm de FOXO1**

30 Como se ejemplifica en la Figura 14, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y los métodos de las mismas en la presente divulgación pueden proporcionar la escisión controlada de polímeros de ácido nucleico. En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados de la presente invención producen un patrón de escisión alterado en términos del número de sitios de escisión, la localización de sitios de escisión y/o el porcentaje relativo de escisión de sitios de escisión. En algunas realizaciones, como se ejemplifica por ONT-401 y ONT-406, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionan la escisión de sitio  
35 único.

40 En algunas realizaciones, solo se detectó un componente de la escisión de ARN. Sin la intención de limitar por teoría, el solicitante observa que dicha observación podría ser debida a la naturaleza procesiva de la enzima RNasa H, que podría hacer múltiples cortes en el mismo dúplex dando como resultado fragmentos 5'-OH 3'-OH mucho más cortos.

45 Se probaron además composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados adicionales. Como se ha descrito anteriormente, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas proporcionan resultados inesperados, por ejemplo, en términos de la tasa de escisión y % de ARN que queda en el dúplex de ADN/ARN. Véanse las Figuras 15-17. Los datos analíticos de ejemplo se presentaron en las Figuras 18-20. Sin la intención de limitar por teoría, el solicitante observa que en algunas realizaciones la escisión puede ocurrir como se representa en la Figura 21. En la Figura 17, se observa que ONT-406 causa la escisión del ARN duplexado a una tasa en ligero exceso de la del oligonucleótido de ADN natural ONT-415, que tiene la misma secuencia de bases y longitud. El solicitante observa que las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados de ONT-406, y otras  
50 composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas en la presente divulgación, tienen otras propiedades preferidas que no tiene una composición de ONT-415, por ejemplo, mejores perfiles de estabilidad *in vitro* y/o *in vivo*. Datos adicionales a modo de ejemplo se presentaron en la Figura 25. Por tanto, como será apreciado por los expertos en la técnica, datos a modo de ejemplo ilustrados en la Figura 26 y Figura 27 confirman que las  
55

composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo proporcionadas, especialmente cuando se diseñaron así para controlar los patrones de escisión mediante patrones de centros quirales del esqueleto, produjeron resultados mucho mejores que las composiciones de oligonucleótidos de referencia, por ejemplo, una composición de oligonucleótidos estereoaleatoria. Como se ejemplifica en la Figura 26, los patrones controlados de centros quirales del esqueleto pueden, entre otras cosas, aumentar y/o disminuir selectivamente la escisión en el sitio de escisión existente cuando se usa un oligonucleótido de ADN, o crear sitios de escisión completamente nuevos que no existen cuando se usa un oligonucleótido de ADN (véase la Figura 25, ONT-415). En algunas realizaciones, los sitios de escisión de un oligonucleótido de ADN indican la preferencia de escisión endógena de RNasa H. Como se confirmó por la Figura 27, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas son capaces de modular la tasa de escisión objetivo. En algunas realizaciones, aproximadamente el 75 % de la varianza en la actividad celular se explica por las diferencias en la tasa de escisión que se pueden controlar mediante patrones de centros quirales del esqueleto. Como se proporciona en la presente solicitud, se pueden combinar características estructurales adicionales, tales como modificaciones de bases y sus patrones, modificación de azúcares y sus patrones, modificaciones del enlace internucleotídico y sus patrones, y/o cualquier combinación de los mismos, con patrones de centros quirales del esqueleto para proporcionar las propiedades de oligonucleótidos deseadas.

#### **Ejemplo 9. Supresión específica de alelo a modo de ejemplo de mHTT**

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados y métodos de las mismas para la supresión específica de alelo de transcritos de un alelo particular con selectividad con respecto a los otros. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la supresión específica de alelo de mHTT.

La Figura 22 ilustra composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo que suprimen específicamente transcritos de un alelo pero no los otros. Se probaron los oligonucleótidos 451 y 452 con transcritos de ambos alelos ejemplificados usando los ensayos bioquímicos descritos anteriormente. La supresión específica de alelo también se prueba en células y modelos animales usando procedimientos similares, como se describe en Hohjoh, Pharmaceuticals 2013, 6, 522-535; publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2013/0197061; y Østergaard et al., Nucleic Acids Research, 2013, 41(21), 9634-9650. En todos los casos, los transcritos del alelo diana se suprimen selectivamente con respecto a los de los otros alelos. Como será apreciado por los expertos en la técnica, los datos a modo de ejemplo ilustrados en la Figura 22 confirman que las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo proporcionadas, especialmente cuando se diseñaron así para controlar los patrones de escisión mediante estereoquímica, produjeron resultados mucho mejores que las composiciones de oligonucleótidos de referencia, en este caso, una composición de oligonucleótidos estereoaleatoria. Como se confirmó por la Figura 22, los patrones de centros quirales del esqueleto pueden cambiar espectacularmente los patrones de escisión (Figura 22 C-E), y se pueden emplear patrones estereoquímicos para posicionar el sitio de la escisión en el sitio de desapareamiento (Figura 22 C-E), y/o pueden mejorar espectacularmente la selectividad entre el mutante y natural (Figura 22 G-H). En algunas realizaciones, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados se incuban con ARNwt y ARNm de una diana y ambos dúplex se incuban con RNasa H.

T<sub>m</sub> del alelo de huntingtina

Alelo de huntingtina mutante ONT-453/ONT-451	38,8 °C
Alelo de huntingtina natural ONT-454/ONT-451	37,3 °C
Alelo de huntingtina mutante ONT-453/ONT-452	38,8 °C
Alelo de huntingtina natural ONT-454/ONT-452	36,5 °C
Alelo de huntingtina mutante ONT-453/ONT-450	40,3 °C
Alelo de huntingtina natural ONT-454/ONT-450	38,8 °C

#### **Ejemplo 10. Supresión específica de alelo a modo de ejemplo de FOXO1**

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona la supresión específica de alelo de FOXO1.

La Figura 23 ilustra composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados a modo de ejemplo que suprimen específicamente transcritos de un alelo pero no los otros. Se probaron los oligonucleótidos ONT-400, ONT-402 y ONT-406 con transcritos de ambos alelos ejemplificados usando los ensayos bioquímicos descritos anteriormente. La supresión específica de alelo también se prueba en células y modelos animales usando procedimientos similares, como se describe en Hohjoh, Pharmaceuticals 2013, 6, 522-535; publicación de solicitud de patente de EE. UU. US 2013/0197061; Østergaard et al., Nucleic Acids Research 2013, 41(21), 9634-9650; y Jiang et al., Science 2013, 342, 111-114. Los transcritos del alelo diana se suprimen selectivamente con respecto a los de los otros alelos. En algunos casos, se sintetizan dos ARN con el desapareamiento ONT-442 (A/G, posición 7<sup>a</sup>) y ONT-443 (A/G, posición 13<sup>a</sup>) de



ONT-388 y se duplexan con ONT-396 a ONT-414. Se realiza el ensayo de RNasa H para obtener las tasas de escisión y los mapas de escisión.

**Ejemplo 11. Ciertos oligonucleótidos y composiciones de oligonucleótidos a modo de ejemplo**

5

Oligonucleótidos estereoealeatorios con diferentes químicas de sustitución en 2' que se dirigen a tres regiones de ARNm distintas de FOXO1 con las temperaturas de fusión térmica cuando se duplexan con ARN complementario. La concentración de cada cadena fue 1  $\mu$ M en 1X tampón PBS.

Oligo	Secuencia	Descripción	T <sub>m</sub> (°C)	SEQ ID NO:
ONT-316	TeosAeosGeos5mCeos5mCeosdAsdTsdTsdGs5mdCsdAsdGs5mdCsdTsdGs5mCeosTeos5mCeosAeos5mCeo	5-10-5 (gápmero 2'-MOE)	76,7	516
ONT-355	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdsgscasgscsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	Gápmero 7-6-7 (ADN-2'-OMe-ADN)	71,2	517
ONT-361	tsasgsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTscsasc	Gápmero 3-14-3 (2'-OMe-ADN-2'-OMe)	65,8	518
ONT-367	dTsdAsdGsdCsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGsdCsdTsdCsdAsdC	Todo ADN	62,9	519
ONT-373	tsasgsdCsdAsdTsdTsdGsdCsdAsdGsdCsdTsdGscstscsasc	5-10-5 (gápmero 2'-OMe)	71,8	520
ONT-388	rGrUrGrArGrArGrUrGrCrArArUrGrGrUrA	ARN complementario		521
ONT-302	Teos5mCeos5mCeosAeosGeosdTsdTs5mdCs5mdCsdTsdTs5mdCsdAsdTsdTs5mCeosTeosGeos5mCeosAeo	5-10-5 (gápmero 2'-MOE)	72,5	522
ONT-352	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTscacstscsascsdTsdTsdCsdTsdGsdCsda	Gápmero 7-6-7 (ADN-2'-OMe-ADN)	65,4	523
ONT-358	tsascsdAsdGsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCsdTsdTsgsasc	Gápmero 3-14-3 (2'-OMe-ADN-2'-OMe)	62,6	524

Oligo	Secuencia	Descripción	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-364	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCs dTsdCsdCsdA	Todo ADN	58,4	525
ONT-370	tsccscasgsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTscstsgscsa	5-10-5 (gápnero 2'-OMe)	68	526
ONT-386	rUrGrCrArGrArUrUrGrArArGrArCrUrGrGrA	ARN complementario		527
ONT-315	TeosGeosAeosGeosAeosdTsdGs5mC55mCsdTsdGsdC55 mCsdTsdGs5mCeos5mCeosAeosTeosAeo	5-10-5 (gápnero 2'-MOE)	77,5	528
ONT-354	dTsdGsdAsdTsdGsdAsdTsdGscscstsgsgscsdTsdGsdCsdCsdAsd TsdA	Gápnero 7-6-7 (ADN-2'-OMe-ADN)	75,5	529
ONT-360	tsgsasdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdCsdC asissas	Gápnero 3-14-3 (2'-OMe-ADN-2'- OMe)	69	530
ONT-366	dTsdGsdAsdTsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdCsdTsdGsdC sdCsdAsdTsdA	Todo ADN	66,5	531
ONT-372	tsgsasgsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdCsdTsdGscscsastsa	5-10-5 (gápnero 2'-OMe)	74,4	532
ONT-387	rUrArUrGrGrArGrCrGrArGrCrArUrCrUrCrA	ARN complementario		533

A continuación se enumeran composiciones de oligonucleótidos estereoaleatorias a modo de ejemplo adicionales.

Oligo	Secuencia	Descripción	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-316	T eosA eos5mC eos5mC eosdAsdTs dTs dGs5mdCsdAsdGs s5mdCsdTs dGs5mC eos Teos5mC eosA eos5mC eo	5-10-5 (gápmero 2'-MOE)	76,7	516
ONT-355	dTs dAsdGs dCsdAsdTs ts gscs agscsdTs dGs dCsdTs dCsd AsdC	Gápmero 7-6-7 (ADN-2'-OMe-ADN)	71,2	517
ONT-361	ts agsdCsdCsdAsdTs dTs dGs dCsdAsdGs dCsdTs dGs dCsdTs c sascs	Gápmero 3-14-3 (2'-OMe-ADN-2'- OMe)	65,8	518
ONT-367	dTs dAsdGs dCsdCsdAsdTs dTs dGs dCsdAsdGs dCsdTs dGs dC sdTs dCsdAsdC	Todo ADN	62,9	519
ONT-373	ts agscscsdAsdTs dTs dGs dCsdAsdGs dCsdTs dGs cts csasc rGrUrGrArGrArGrUrGrCr ArArUrGrGrCrUrA	5-10-5 (gápmero 2'-OMe) ARN complementario	71,8	520 521
ONT-302	T eos5mC eos5mC eosA eosGeos dTs dTs5mdC s5mdCsdTs dTs 5mdCsdAsdTs dTs5mC eos TeosGeos5mC eosA eo	5-10-5 (gápmero 2'-MOE)	72,5	522
ONT-352	dTs dCsdCsdAsdGs dTs dTs esc ts ts cs sdTs dTs dCsdTs dGs dCs dA	Gápmero 7-6-7 (ADN-2'-OMe-ADN)	65,4	523
ONT-358	ts cs cs dAsdGs dTs dTs dCsdTs dTs dCsdAsdTs dTs dGs dTs g scsas	Gápmero 3-14-3 (2'-OMe-ADN-2'- OMe)	62,6	524

Oligo	Secuencia	Descripción	Tm (°C)	SEQ ID NO:
ONT-364	dTsdCsdCsdAsdGsdTsdTsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTsdCs dTsdGsdCsdA	Todo ADN	58,4	525
ONT-370	tsccsagsdTsdsdCsdCsdTsdTsdCsdAsdTsdTscstsgscsa	5-10-5 (gápmero 2'-OMe)	68	526
ONT-386	rUrGrCrArGrArUrGrArArGrArArCrUrGrGrA	ARN complementario		527
ONT-315	TeosGeosAeosGeosAeosdTsdGs5mdCs5mdCsdTsdGsdGs5 mdCsdTsdGs5mCeos5mCeosAeosTeosAeo	5-10-5 (gápmero 2'-MOE)	77,5	528
ONT-354	dTsdGsdAsdTsdGsdAsdTsdGscscstsgscsdTsdGsdCsdCsdAsd TsdA	Gápmero 7-6-7 (ADN-2'-OMe-ADN)	75,5	529
ONT-360	tsgsasdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdCsdCs astscas	Gápmero 3-14-3 (2'-OMe-ADN-2'- OMe)	69	530
ONT-366	dTsdGsdAsdTsdGsdAsdTsdGsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGsdC sdCsdAsdTsdA	Todo ADN	66,5	531
ONT-372	tsgeagsasdTsdsdCsdCsdTsdGsdGsdCsdTsdGscscsastsa	5-10-5 (gápmero 2'-OMe)	74,4	532
ONT-387	rUrArUrGrCrArGrCrArGrCrArUrCrUrCrA	ARN complementario		533

A continuación se enumeran oligonucleótidos de ARN y ADN a modo de ejemplo.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
ONT-41	(Gs5mCs5mCsTs5mCs)MOE d AsGsTs5mCsTsGs5mCsTsTs5mCs (Gs5mCsAs5mCs5mC)MOE	534
ONT-70	(Gs5mCs)MOE d GsTsTsGs5mCsTs5mCsTsTs5mCsTsTs (5mCsTsTsGs5mCGs)MOE d TsTsTsTs (TsT)MOE	535
ONT-83	(GsTs5mCs5mCs5mCs)MOE d TsGsAsAsGsAsTsGsTs5mCs (AsAsTsGs5mC)MOE	536
ONT-302	(Ts5mCs5mCsAsGs)MOE d TsTs5mCs5mCsTsTs5mCsAsTsTs (5mCsTsGs5mCsA)MOE E	537
ONT-315	(TsGsAsGsAs)MOE d TsGs5mCs5mCsTsGsGs5mCsTsGs (5mCs5mCsAsTsA)MOE	538
ONT-316	(TsAsGs5mCs5mCs)MOE d AsTsTsGs5mCsAsGs5mCsTsGs5mC (CsTs5mCsAs5mC)MOE	539
ONT-352	[TsCsCsAsGsTsTs (cscstiscsas)MOE d TsTsCsTsGsCsA]	540



Oligo	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
ONT-354	[TsGsAsGsAsTsGs] (CsCsTsGsGsCs) <sub>OMed</sub> [TsGsCsCsAsTsA]	541
ONT-355	[TsAsGsCsCsAsTs](TsGsCsAsGsCs) <sub>OMed</sub> [TsGsCsTsCsAsC]	542
ONT-358	(TsCsCs) <sub>OMed</sub> [AsGsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTs](GsCsA) <sub>OMe</sub>	543
ONT-360	(TsGsAs) <sub>OMed</sub> [GsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCs](AsTsA) <sub>OMe</sub>	544
ONT-361	(TsAsGs) <sub>OMed</sub> [CsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTs](CsAsC) <sub>OMe</sub>	545
ONT-364	[TsCsCsAsGsTsTsCsCsTsTsCsAsTsTsCsTsGsCsA]	546
ONT-366	[TsGsAsGsAsTsGsCsCsTsGsGsCsTsGsCsCsAsTsA]	547
ONT-367	[TsAsGsCsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	548
ONT-370	(TsCsCsAsGs) <sub>OMed</sub> [TsTsCsCsTsTsCsAsTsTs](CsTsGsCsA) <sub>OMe</sub>	549
ONT-372	(TsGsAsGsAs) <sub>OMed</sub> [TsGsCsCsTsGsGsCsTsGs](CsCsAsTsA) <sub>OMe</sub>	550
ONT-373	(TsAsGsCsCs) <sub>OMed</sub> [AsTsTsGsCsAsGsCsTsGs](CsTsCsAsC) <sub>OMe</sub>	551
ONT-440	(UsAsGsCsCs) <sub>Fd</sub> [AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	552
ONT-441	(UsAsGsCsCs) <sub>Fd</sub> [AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsC]	553
ONT-460	(TsAsGsCsCs) <sub>OMed</sub> [AsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	554
ONT-450	[AsTsTsAsAsTsAsAsTsTsGsTsCsAsTsCsAsCsC]	555

A continuación se enumeran oligonucleótidos de ARN y ADN a modo de ejemplo

Oligo	Secuencia (5' a 3')	SEQ ID NO:
ONT -28	rGrGrUrGrCrGrArArGrCrArGrArCrUrGrArGrGrC	556
ONT-386	rUrGrCrArGrArArUrGrArArGrGrArArCrUrGrGrA	557
ONT-387	rUrArUrGrGrCrArGrCrCrArGrGrCrArUrCrUrCrA	558
ONT-388	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCr ArArUrGrGrCrUrA	559
ONT-415	d[TAGCCATTGCAGCTGCTCAC]	560
ONT-442	rGrUrGrArGrCrGrGrCrUrGrCrArArUrGrGrCrUrA	561
ONT-443	rGrUrGrArGrCrArGrCrUrGrCrGrArUrGrGrCrUrA	562
ONT-453	rGrGrUrGrArUrGrArCrArArUrUrArUrUrArArU	563
ONT-454	rGrGrUrGrArUrGrGrCrArArUrUrArUrUrArArU	564

- 5 A continuación se presentan oligonucleótidos quiralmemente puros a modo de ejemplo. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados correspondientes de cada uno de los siguientes oligonucleótidos a modo de ejemplo.

Oligo	Estereoquímica/Secuencia (5' a 3')	Descripción	SEQ ID NO:
ONT-389*	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsGsAsGsAsTsGsCsTsGsGsTsGsCsTsGsCsAsTsA]	7S-(RSS) <sub>3</sub> -3S	565
ONT-390*	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsGsAsGsAsTsGsCsTsGsGsTsGsCsTsGsCsAsTsA]	6S-(RSS) <sub>3</sub> -4S	566
ONT-391*	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsGsAsGsAsTsGsCsTsGsGsTsGsCsTsGsCsAsTsA]	5S-(RSS) <sub>3</sub> -5S	567
ONT-392-	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsTsGsCsTsGsCsAsCs]	7S-(RSS) <sub>3</sub> -3S	568
ONT-393*	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsTsGsCsTsGsCsAsCs]	6S-(RSS) <sub>3</sub> -4S	569
ONT-394-	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsTsGsCsTsGsCsAsCs]	5S-(RSS) <sub>3</sub> -5S	570
ONT-396	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsTsGsCsTsGsCsAsCs]	18S-1R	571



Oligo	Estereoquímica/Secuencia (5' a 3')	Descripción	SEQ ID NO:
ONT-404	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	10S-(RSS)-6S	579
ONT-405	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	9S-(RSS)-7S	580
ONT-406	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	8S-(RSS)-8S	581
ONT-407	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	7S-(RSS)-9S	582
ONT-408	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	6S-(RSS)-10S	583
ONT-409	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	5S-(RSS)-11S	584
ONT-410	(S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , R <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> , S <sub>p</sub> )-d[TsAsGsCsAsTsTsGsCsAsGsCsTsGsCsTsCsAsC]	4S-(RSS)-12S	585











A continuación se presentan oligonucleótidos adicionales a modo de ejemplo que se dirigen a FOXO1 con Tm. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona composiciones de oligonucleótidos quiralmente controlados correspondientes de cada uno de los siguientes oligonucleótidos a modo de ejemplo.

5



**Ejemplo 12. Escisión controlada adicional a modo de ejemplo por composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas**

5 Como será apreciado por los expertos en la técnica, los datos a modo de ejemplo ilustrados en la Figura 26 confirman que las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas y los métodos de las mismas proporcionaron resultados inesperados en comparación con las composiciones de referencia, tales como las composiciones de oligonucleótidos estereoaleatorios. Entre otras cosas, las composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados pueden producir patrones de escisión controlados, que incluyen, pero no se limitan, el control de posiciones de sitios de escisión, los números de sitios de escisión y el porcentaje relativo de escisión de sitios de escisión. Véanse también los datos a modo de ejemplo presentados en la Figura 27.

**Ejemplo 13. Estabilidad de composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados**

15 Como será apreciado por los expertos en la técnica, los datos a modo de ejemplo ilustrados en la Figura 26 confirman que la estabilidad de composiciones de oligonucleótidos quiralmemente controlados proporcionadas se pueden ajustar variando patrones de centros quirales del esqueleto. Para datos a modo de ejemplo, véase la Figura 7 y la Figura 28. A continuación se describe un protocolo a modo de ejemplo para realizar el experimento de estabilidad en suero.

20 **Protocolo:** Se incubaron ADN de PS P-estereoquímicamente puro (ONT-396-ONT-414 (paso Rp único de extremo 3' a extremo 5')), ADN de PS estereoaleatorio (ONT-367), ADN de PS Todo-Sp (ONT-421) y ADN de PS Todo-Rp (ONT-455) en suero de rata (Sigma, R9759) (0 h y 48 h) y se analizó por IEX-HPLC.

25 **Método de incubación:** Se mezclaron 5 µl de 250 µM de cada disolución de ADN y 45 µl de suero de rata y se incubaron a 37 °C para cada momento de tiempo (0 h y 48 h). En cada momento de tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 25 µl de disolución 150 mM de EDTA, 30 µl de tampón de lisis (erpicentre, MTC096H) y 3 µl de disolución de proteinasa K (20 mg/ml). La mezcla se incubó a 60 °C durante 20 min, luego se inyectó 20 µl de la mezcla a IEX-HPLC y se analizó.

30 **Muestra de control de incubación:** Se prepararon mezcla de 5 µl de 250 µM de cada disolución de ADN y 103 µl de 1x tampón PBS y se analizó 20 µl de la mezcla por IEX-HPLC como controles para comprobar la cuantificación absoluta.

**Método analítico a modo de ejemplo:**

35 IEx-HPLC

A: TrisHCl 10 mM, 50 % de ACN (pH 8,0)

40 B: TrisHCl 10 mM, NaCl 800 mM, 50 % de ACN (pH 8,0)

C: Agua-ACN (1:1, v/v)

Temp : 60 °C

45 Columna: DIONEX DNAPac PA-100, 250 x 4 mm

Gradiente:

	Tiempo	Flujo	% de A	% de B	% de C	% de D	Curva
1	0,00	1,00	95,0	5,0	0,0	0,0	6
2	1,00	1,00	95,0	5,0	0,0	0,0	1
3	2,00	1,00	75,0	25,0	0,0	0,0	6
4	10,00	1,00	5,0	95,0	0,0	0,0	6
5	10,10	1,00	95,0	5,0	0,0	0,0	6
6	12,50	1,00	95,0	5,0	0,0	0,0	1

50

## ES 2 917 473 T3

Lavado:

	Tiempo	Flujo	% de A	% de B	% de C	% de D	Curva
1	0,01	1,00	0,0	0,0	100,0	0,0	6
2	5,50	1,00	0,0	0,0	100,0	0,0	1
3	5,60	1,00	0,0	100,0	0,0	0,0	6
4	7,50	1,00	0,0	100,0	0,0	0,0	1
5	7,60	1,00	95,0	5,0	0,0	0,0	6
6	12,50	1,00	95,0	5,0	0,0	0,0	1

- 5 Temperatura de la columna: 60 °C.  
 El lavado se realizó cada vez después de la ejecución de la muestra.
- 10 El porcentaje de ADN de PS restante se calculó por el análisis de la relación entre 0 h y 48 h usando el área de integración del cromatograma de HPLC.

### **Ejemplo 14. Resultados analíticos a modo de ejemplo (Figura 19)**

- 15 Asignaciones de picos para la Fig. 19 (Panel superior, M12-Expl 1 B10, ONT-354, 30 min)

Tiempo de retención (minutos)	(M-2) <sup>2-</sup>	(M-3) <sup>3-</sup>	(M-4) <sup>4-</sup>	(M-5) <sup>5-</sup>	(M-6) <sup>6-</sup>
2,34	1100,6	733,7			
11,91		1390,6	1042,6		
13,07		1500,08	1125,5		750,73
		1805,29	1354,19		
13,58		1603,39	1202,2	961,35	801,15
14,80			1589,9	1271,4	1059,5
18,59			1653,3	1323,3	1101,6
Tiempo de retención (minutos)	MW observado	Asignación basada en la correspondencia de masa			
		Fragmento 5'-p-ARN	3'-OH y 5'-OH, ARN	ADN	
2,34	2203,2		7mero		
11,91	4176	13mero			
13,07	4505,7	14mero			
	5418,87		17mero		
13,58	4812,8	15mero			
14,80	6362,5		20mero, ONT-387		
18,59	6615,4			ONT-354	

## ES 2 917 473 T3

Asignaciones de picos para la Fig. 19 (panel inferior, M12-Expl 1 A10, ONT-315, 30 min)

Tiempo de retención (minutos)	(M-2) <sup>2-</sup>	(M-3) <sup>3-</sup>	(M-4) <sup>4-</sup>	(M-5) <sup>5-</sup>	(M-6) <sup>6-</sup>
4,01	1425,33	950,15			
4,4	1100,83	733,69			
4,94	1578,34	1051,54			
6,21	1741,91	1161,89	870,37		
	1445,42	963,31	722,97		
8,48	1610	1073,3			
9,15		1391,2	1043,1		
9,93	1763,4	1174,7			
11,8		1602,3	1201,7		
14,82					
20,73			1809,94	1447,82	1205,9
Tiempo de retención (minutos)	MW observado	Asignación basada en la correspondencia de masa			
		Fragmento 5'-p-ARN	3'-OH y 5'-OH, ARN	ADN	
4,01	2853,45		9mero		
4,4	2203,66	7mero			
4,94	3158,47		10mero		
6,21	3487,52		11mero		
	2892,84	9mero			
8,48	3220,94	10mero			
9,15	4177		13mero		
9,93	3528,88	11mero			
11,8	4810		15mero		
14,82			20mero, ONT-387		
20,73	7244,3			ONT-315	

### 5 **Ejemplo 15. Resultados analíticos a modo de ejemplo (Figura 30)**

Asignaciones de picos para la Fig. 30 (panel superior, M12-Expl 1 D2, ONT-367, 30 min)

Tiempo de retención (minutos)	(M-2) <sup>2-</sup>	(M-3) <sup>3-</sup>	(M-4) <sup>4-</sup>	(M-5) <sup>5-</sup>	(M-6) <sup>6-</sup>
2,36	1120,28	746,25			
3,15	1292,41	861,32			
4,04	975,92				
4,49	1140,6	759,78			
5,83	1305,21	869,65	652,31		
6,88	1923,23	1281,69	961,28		
9,32		1390,76	1043,29	833,72	
9,96	1783,85	1187,98	891,6	712,94	

ES 2 917 473 T3

Tiempo de retención (minutos)	(M-2) <sup>2-</sup>	(M-3) <sup>3-</sup>	(M-4) <sup>4-</sup>	(M-5) <sup>5-</sup>	(M-6) <sup>6-</sup>
11,01	1936,14	1289,93			
		1501,52	1125,4	899,89	
11,93		1405,25	1053,78	842,84	
13,15		1514,72	1135,72		
14,81			1609,95	1287,53	1072,58
18,33			1587,9	1270,2	1058,3
Tiempo de retención (minutos)	MW observado	Asignación basada en la correspondencia de masa			
		Fragmento 5'-p-ARN	3'-OH y 5'-OH, ARN	ADN	
2,36	2242,56		7mero		
3,15	2586,82		8mero		
4,04	1953,84	6mero			
4,49	2283,2	7mero			
5,83	2612,42	8mero			
6,88	3849,14		12mero		
9,32	4175,28		13mero		
9,96	3569,7	11mero			
11,01	3874,28	12mero			
	4507,56		14mero		
11,93	4218,75	13mero			
13,15	4547,16	14mero			
14,81	6441,8		20mero, ONT-388		
18,33	6355,6			ONT-367	

Asignaciones de picos para la Fig. 30 (panel inferior, M12-Exp21 NM Placa1 (conjunto) F11 ONT-406 30 min

Tiempo de retención (minutos)	(M-2) <sup>2-</sup>	(M-3) <sup>3-</sup>	(M-4) <sup>4-</sup>	(M-5) <sup>5-</sup>	(M-6) <sup>6-</sup>
4,72	1140,6	759,78			
9,46		1390,76	1043,29	833,72	
16,45			1609,95	1287,53	1072,58
19,48			1588,1	1270,4	1058,4
Tiempo de retención (minutos)	MW observado	Asignación basada en la correspondencia de masa			
		Fragmento 5'-p-ARN	3'-OH y 5'-OH, ARN	Fragmento 5'-p-ARN	
4,72	2203,2	2283,2	7mero		
9,46	4176	4175,28		13mero	
16,45	6362,5	6441,8		20mero, ONT-388	
19,48	6615,4	6355,9			

**Equivalentes**

- Habiendo descrito algunas realizaciones ilustrativas de la invención, debería ser evidente para los expertos en la técnica que lo anterior es meramente ilustrativo y no limitativo, habiéndose presentado únicamente a modo de ejemplo.
- 5 La invención reivindicada se define en las reivindicaciones adjuntas. Aunque muchos de los ejemplos presentados en el presente documento implican combinaciones específicas de actos de método o elementos de sistema, se debe entender que los actos y los elementos se pueden combinar de otras maneras para lograr los mismos objetivos. Los actos, los elementos y las características tratados solo a propósito de una realización no pretenden ser excluidos de una función similar en otras realizaciones.
- 10 El uso de términos ordinales tales como "primero", "segundo", "tercero", etc., en las reivindicaciones para modificar un elemento de reivindicación no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de un elemento de reivindicación con respecto a otro o el orden temporal en que se realizan los actos de un método, sino que se usan simplemente como marcas para distinguir un elemento de reivindicación que tiene un cierto nombre de otro elemento
- 15 que tiene un mismo nombre (pero para uso del término ordinal) para distinguir los elementos de reivindicación. Similarmente, el uso de a), b), etc., o i), ii), etc., no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden de etapas en las reivindicaciones. Similarmente, el uso de estos términos en la memoria descriptiva no connota por sí mismo ninguna prioridad, precedencia u orden requerido.
- 20 La memoria descriptiva escrita anteriormente se considera que es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no se debe limitar en alcance por los ejemplos proporcionados, puesto que los ejemplos están previstos como una única ilustración de un aspecto de la invención.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición de oligonucleótidos quiralmemente controlados que comprende oligonucleótidos definidos por tener:

- 5           1) una secuencia de bases y longitud comunes;  
             2) un patrón común de enlaces del esqueleto; y  
             3) un patrón común de centros quirales del esqueleto,

10           composición que es una preparación sustancialmente pura de un único oligonucleótido en la que al menos aproximadamente el 10 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto; en donde: la secuencia de bases común tiene al menos 15 bases;

15           el único oligonucleótido tiene una estructura de ala-núcleo-ala, en donde la primera región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases, la segunda región de ala tiene independientemente una longitud de una o más bases, y la región de núcleo tiene una longitud de seis o más bases; la región de núcleo comprende un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de  $(Sp)m(Rp)n$  o  $(Rp)n(Sp)m$ , en donde  $n$  es 1 y  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8; y

20           al menos el 40 % de los enlaces internucleotídicos de fosforotioato del único oligonucleótido son de la configuración  $Sp$ .

25           2. La composición de la reivindicación 1, en donde al menos aproximadamente el 50 % de los oligonucleótidos en la composición tienen la secuencia de bases y longitud comunes, el patrón común de enlaces del esqueleto y el patrón común de centros quirales del esqueleto.

3. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la primera región de ala tiene una longitud de dos o más bases, preferentemente de cinco o más bases.

30           4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la segunda región de ala tiene una longitud de dos o más bases, preferentemente de cinco o más bases.

35           5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región de núcleo tiene una longitud de 10 o más bases, preferentemente de 15 o más bases.

40           6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región de núcleo tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de  $(Sp)m(Rp)n$ , en donde  $n$  es 1 y  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

40           7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región de núcleo tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de SSR.

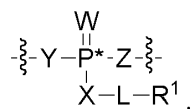
45           8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la región de núcleo tiene un patrón de repetición de estereoquímica de enlace internucleotídico de  $(Rp)n(Sp)m$ , en donde  $n$  es 1 y  $m$  es 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8.

9. La composición de la reivindicación una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el 50 % por ciento o más de los enlaces nucleotídicos quirales de la región de núcleo tienen configuración  $Sp$ .

50           10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde un patrón de repetición es un motivo que comprende al menos aproximadamente el 75 % de centros quirales del esqueleto en la conformación  $Sp$ .

55           11. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde al menos el 50 %, preferentemente al menos el 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, todavía más preferentemente al menos el 80 %, lo más preferentemente el 90 % de los enlaces internucleotídicos de fosforotioato del único oligonucleótido son de la configuración  $Sp$ .

60           12. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada enlace fosfato modificado quiral tiene independientemente la estructura de la fórmula I:



(I)



en donde:

P\* es un átomo de fósforo asimétrico y es o  $P_p$  o  $S_p$ ;

W es O, S o Se;

5 cada uno de X, Y y Z es independientemente -O-, -S-, -N(-L-R<sup>1</sup>)- o L;

L es un enlace covalente o un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub> opcionalmente sustituido, lineal o ramificado, en donde una o más unidades de metileno de L están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

10

R<sup>1</sup> es halógeno, R, o un alifático C<sub>1</sub>-C<sub>50</sub> opcionalmente sustituido, en donde una o más unidades de metileno están opcionalmente e independientemente sustituidas con un alquileo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquenileno C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, -C≡C-, -C(R')<sub>2</sub>-, -Cy-, -O-, -S-, -S-S-, -N(R')-, -C(O)-, -C(S)-, -C(NR')-, -C(O)N(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(O)-, -N(R')C(O)O-, -OC(O)N(R')-, -S(O)-, -S(O)<sub>2</sub>-, -S(O)<sub>2</sub>N(R')-, -N(R')S(O)<sub>2</sub>-, -SC(O)-, -C(O)S-, -OC(O)- o -C(O)O-;

15

cada R' es independientemente -R-, -C(O)R-, -CO<sub>2</sub>R o -SO<sub>2</sub>R, o:

dos R' en el mismo nitrógeno se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido, o

20

dos R' en el mismo carbono se toman conjuntamente con sus átomos intermedios para formar un anillo de arilo, carbocíclico, heterocíclico o de heteroarilo opcionalmente sustituido;

-Cy- es un anillo bivalente opcionalmente sustituido seleccionado de fenileno, carbociclileno, arileno, heteroarileno o heterociclileno;

25

cada R es independientemente hidrógeno, o un grupo opcionalmente sustituido seleccionado de alifático C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, fenilo, carbociclilo, arilo, heteroarilo o heterociclilo; y  
cada



30

representa independientemente una conexión a un nucleósido.

13. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde cada enlace fosfato modificado quiral es un enlace diéster de fosforotioato.

35

14. La composición de la reivindicación 12, en donde X es -S- y -L-R<sup>1</sup> no es hidrógeno.

15. La composición de la reivindicación 12, en donde el único oligonucleótido comprende al menos un enlace internucleotídico de la fórmula I en donde W es S.

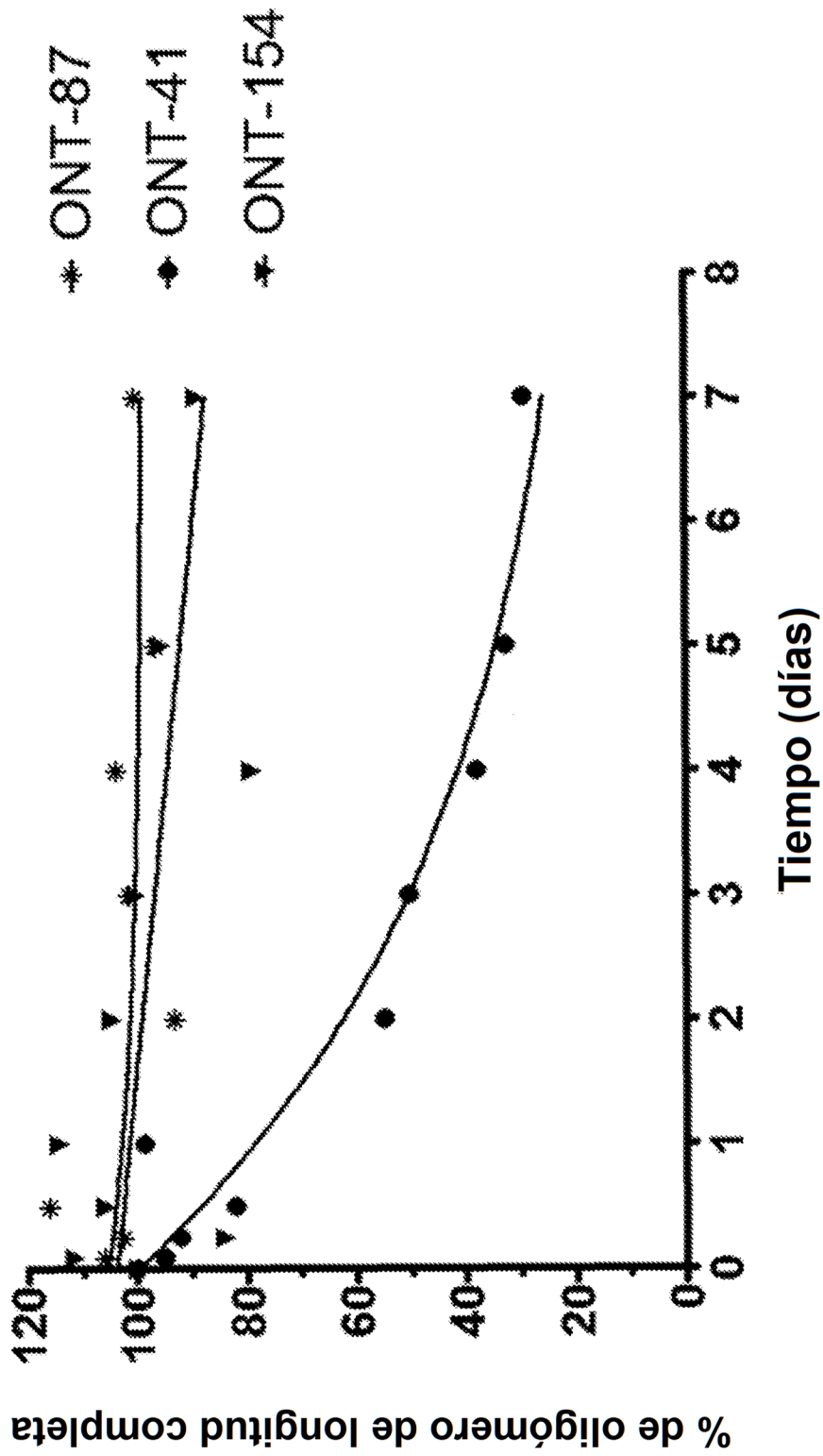


FIG. 1

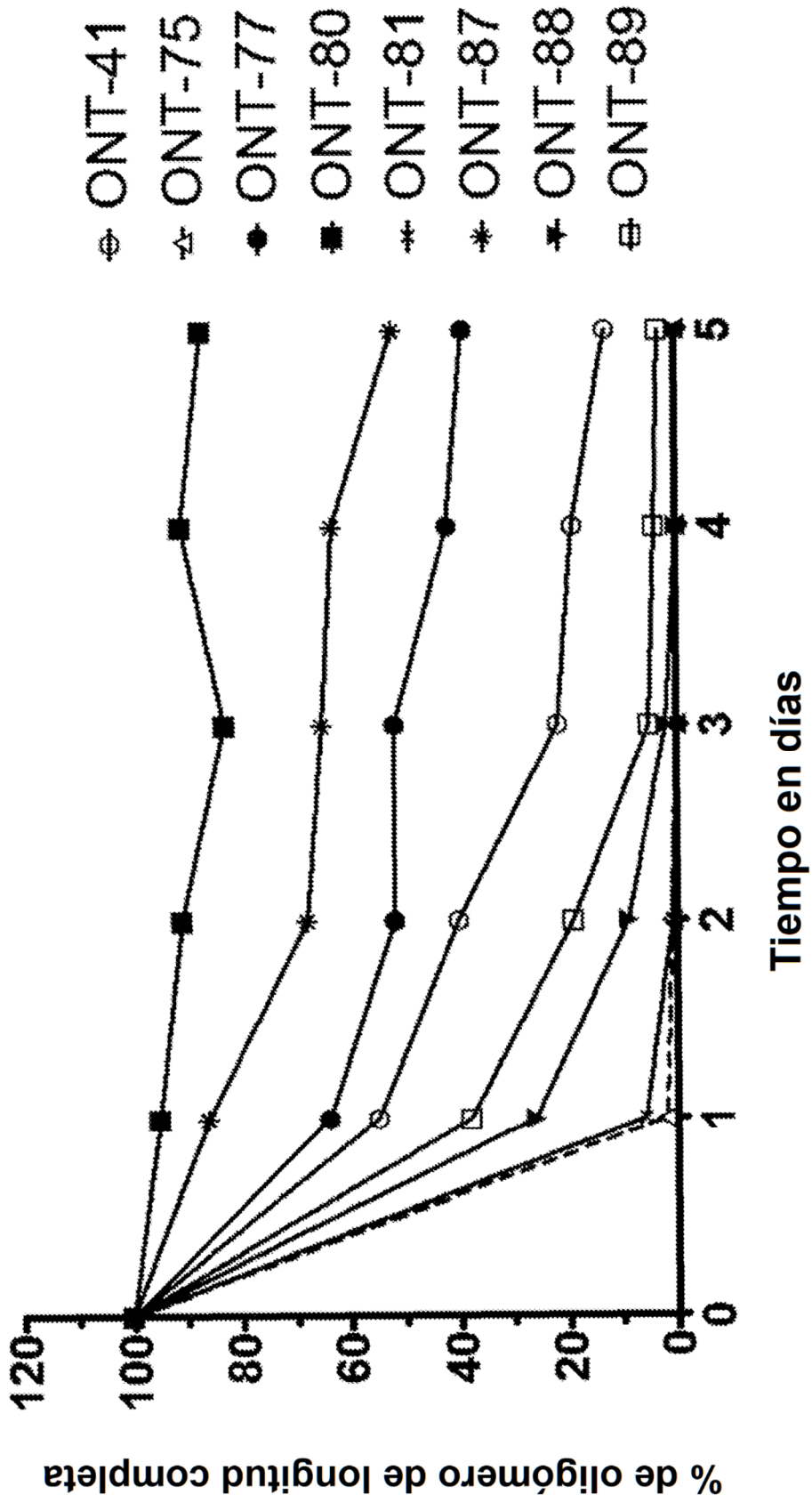


FIG. 2

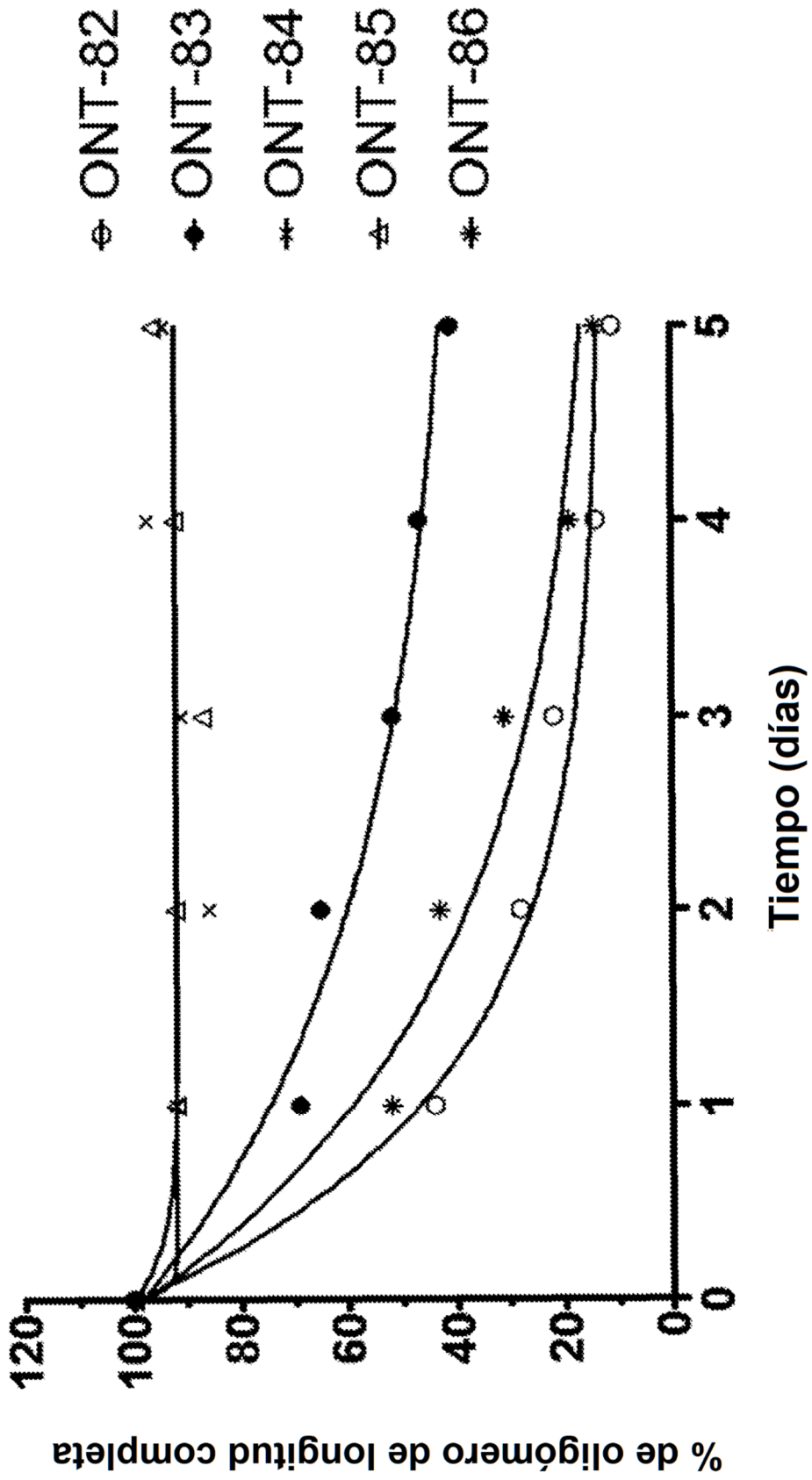


FIG. 3

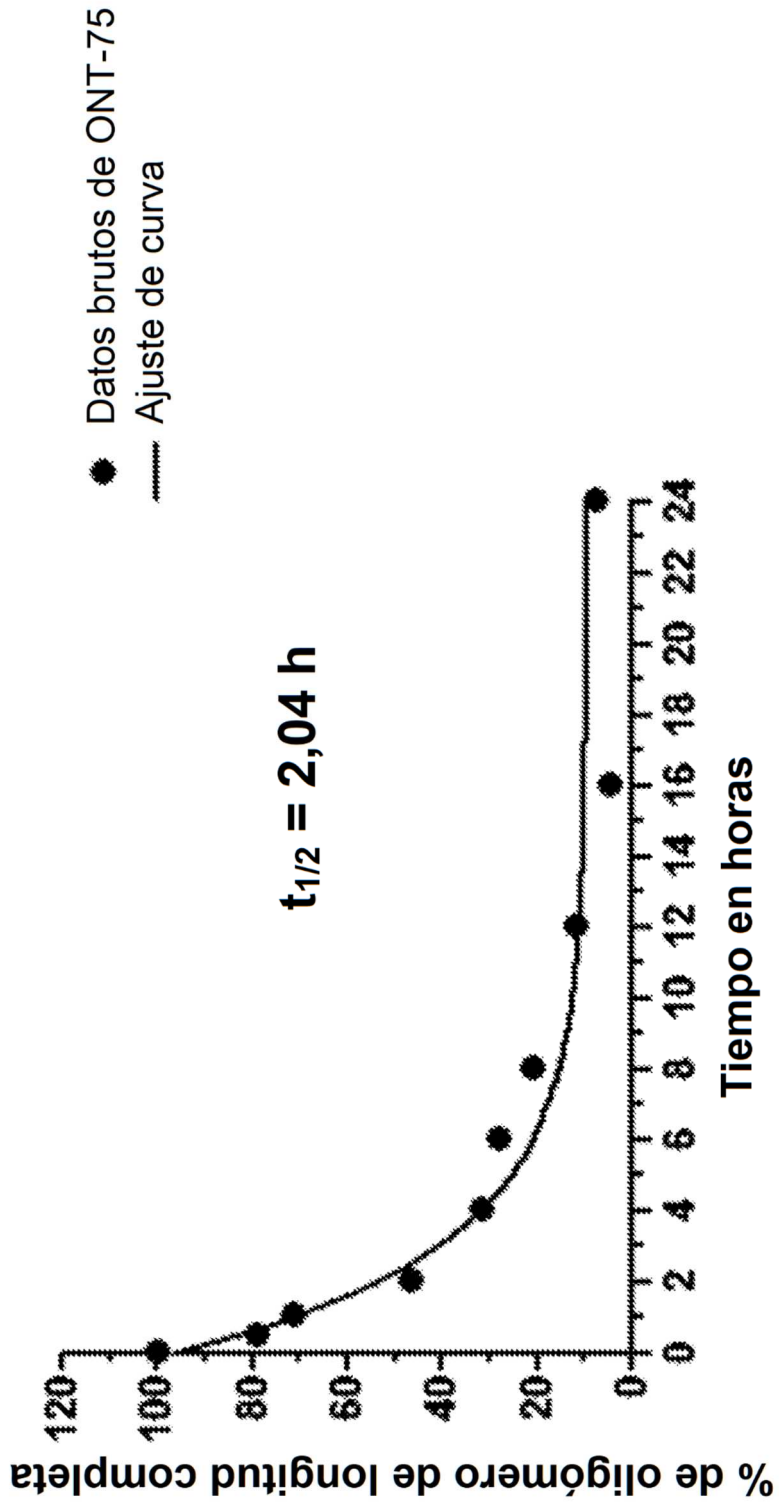


FIG. 4

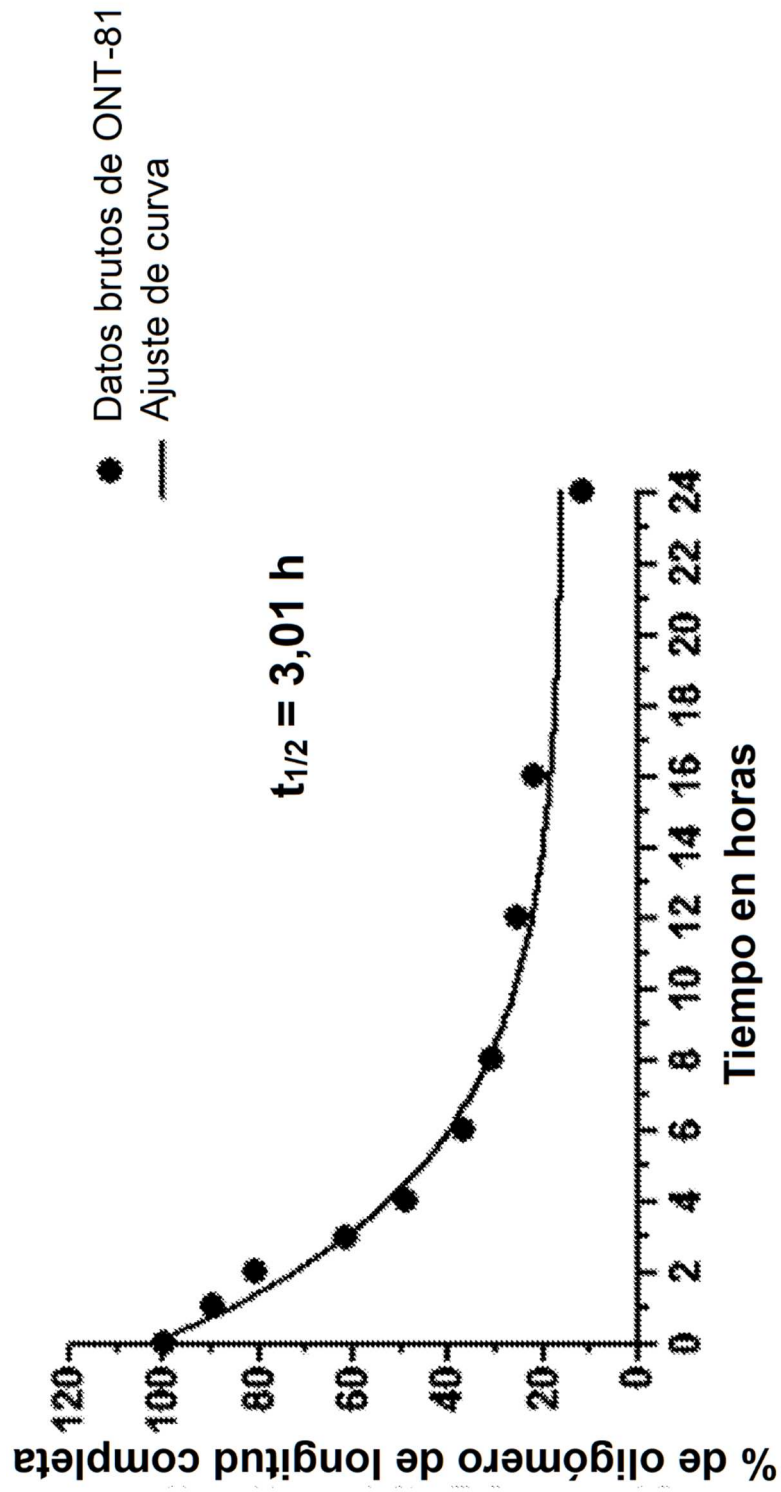


FIG. 5

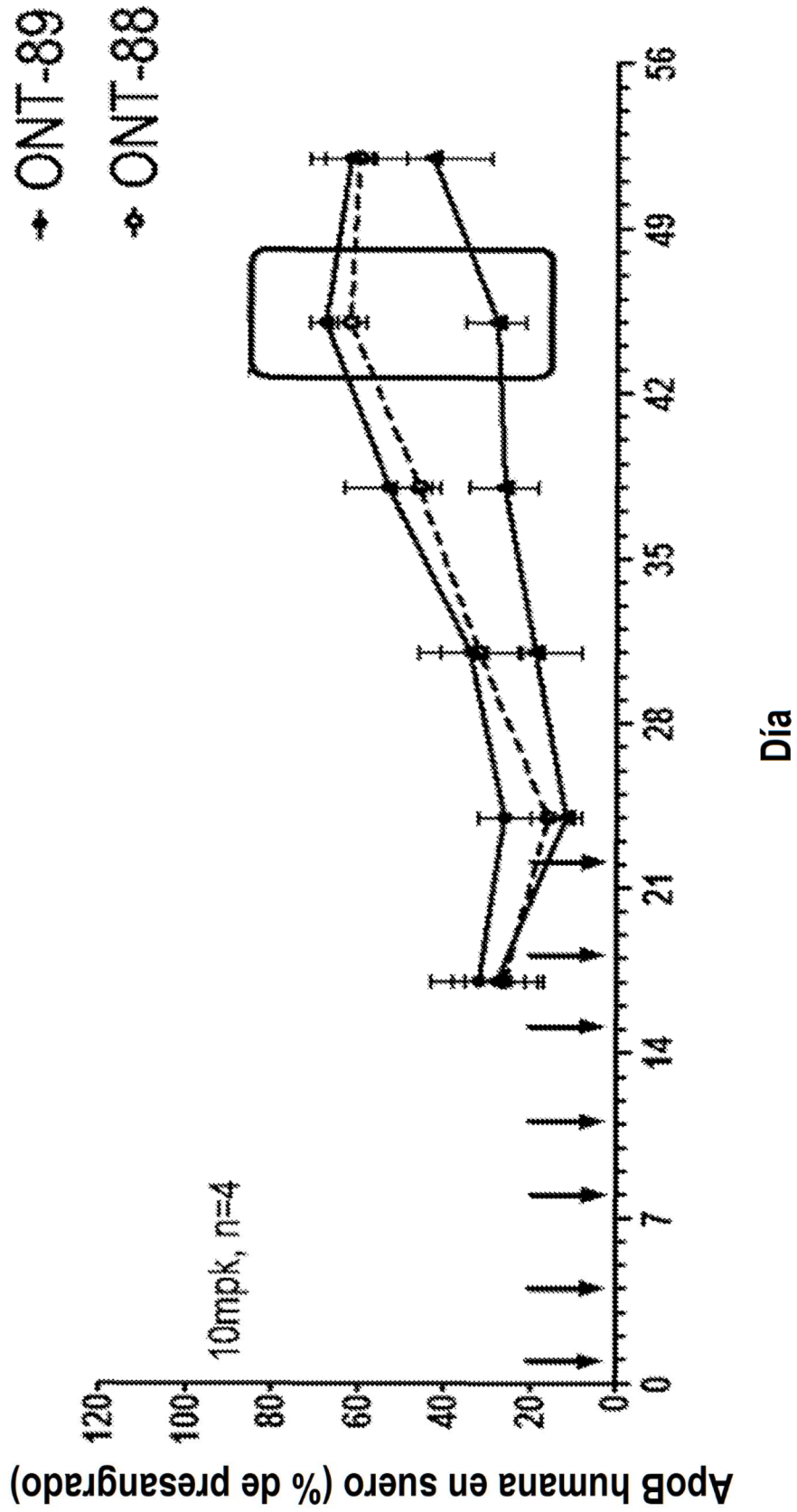


FIG. 6

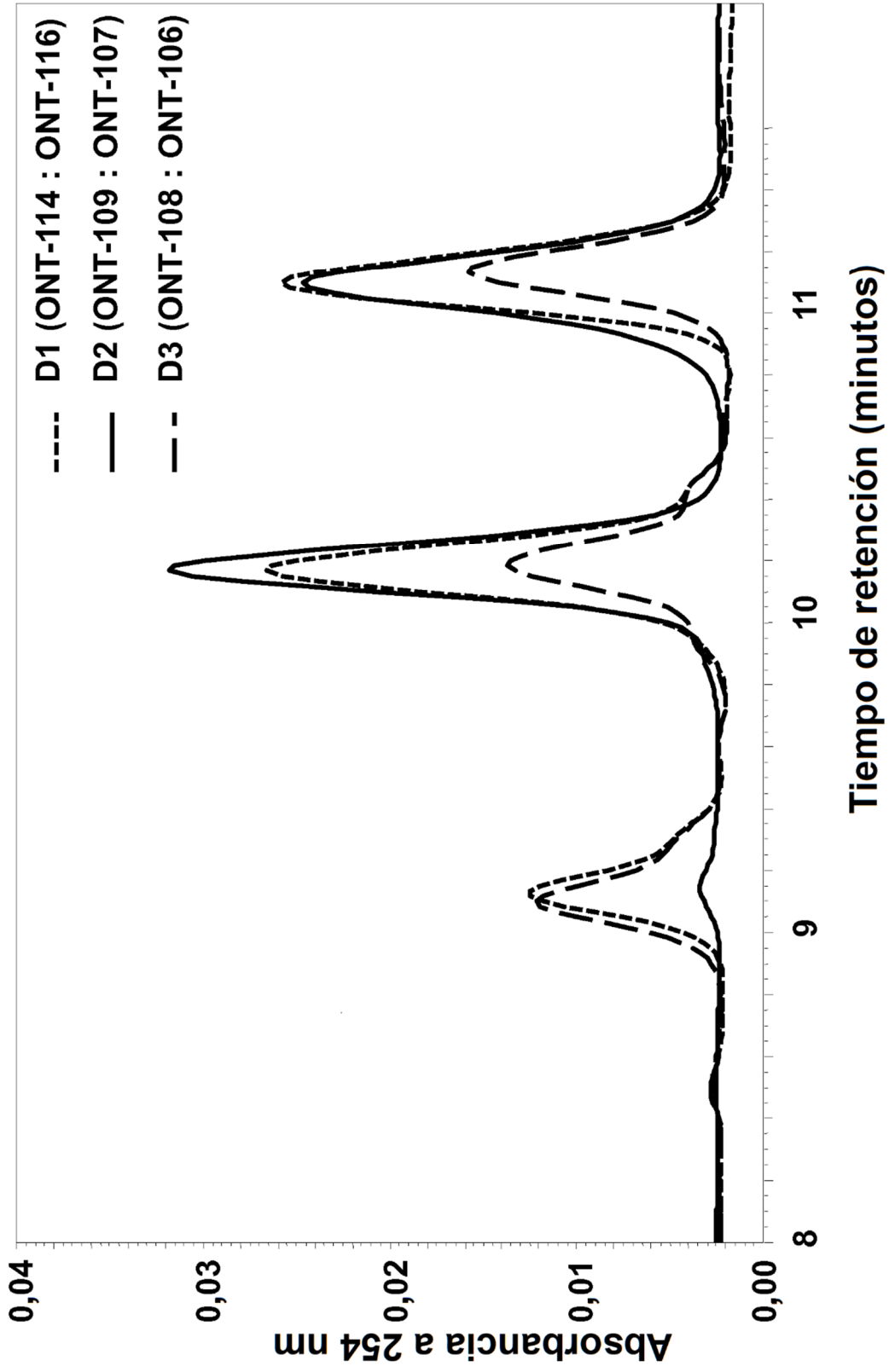


FIG. 7



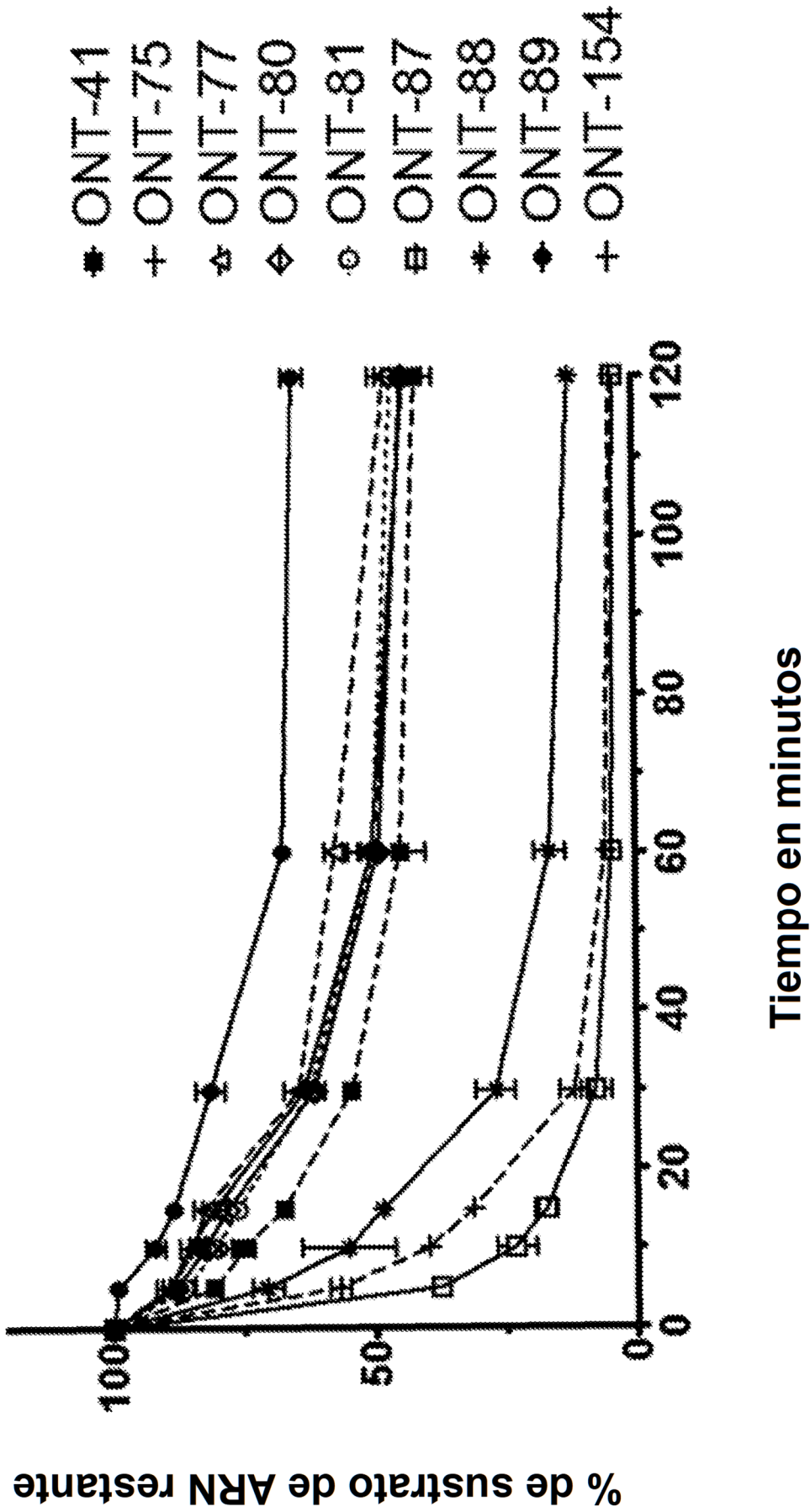
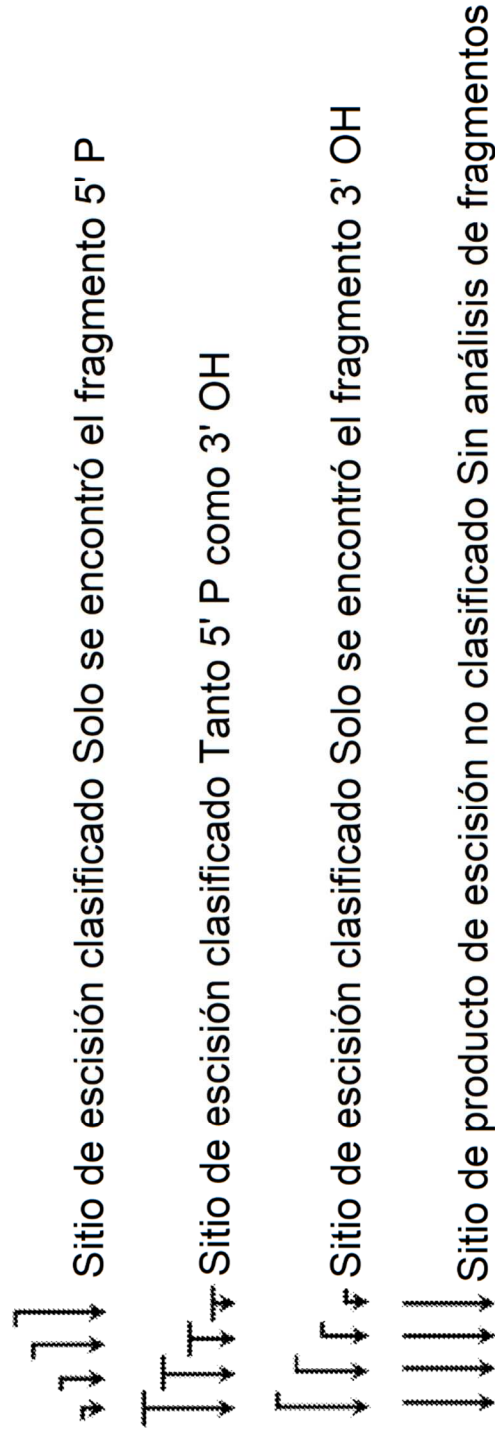
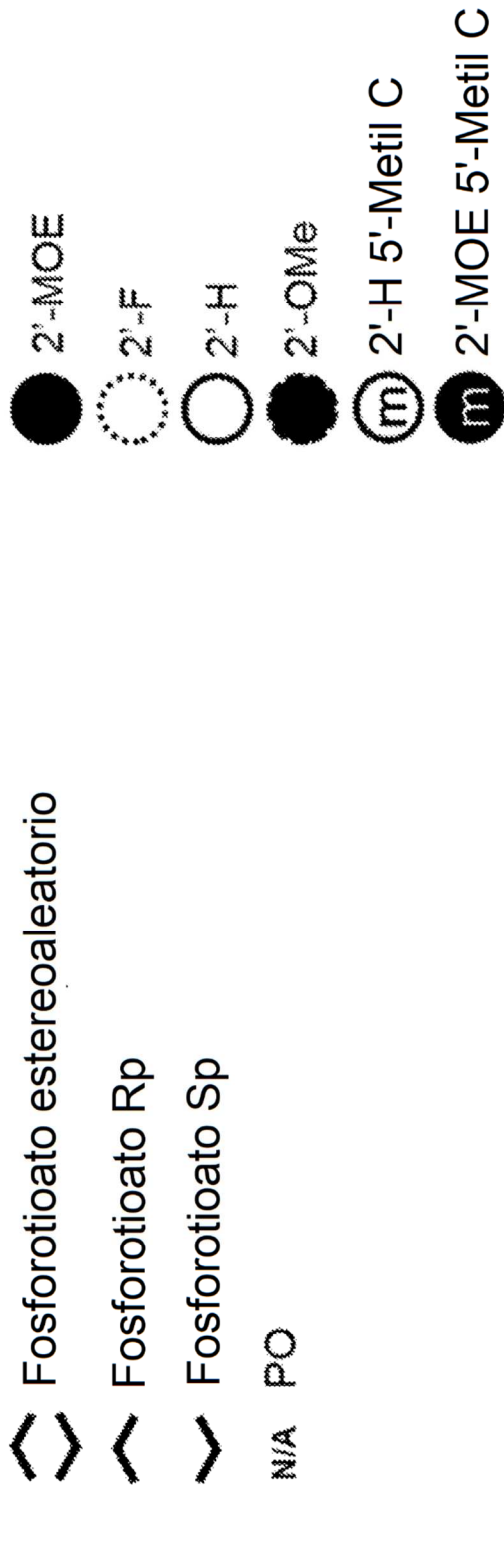
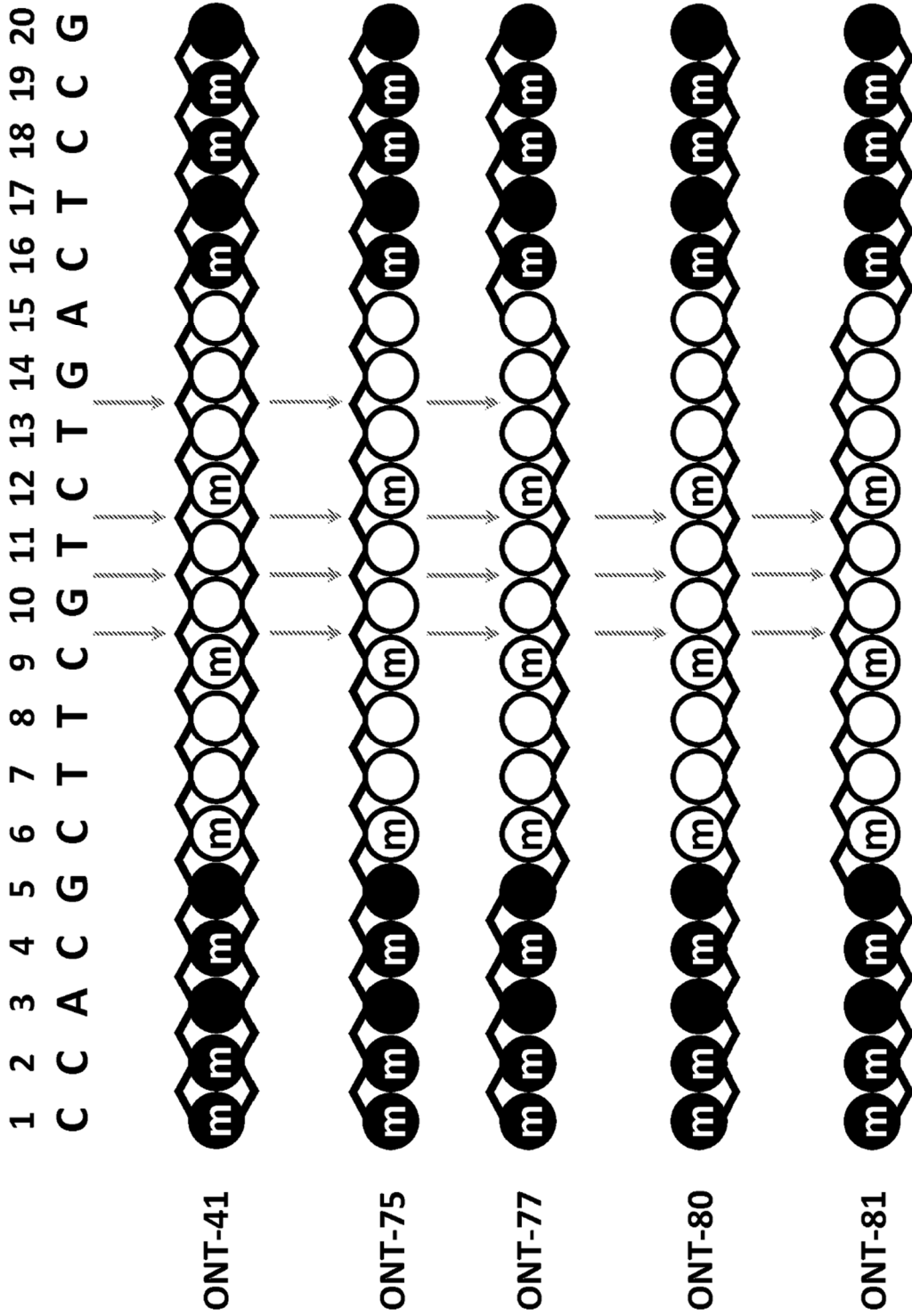


FIG. 8



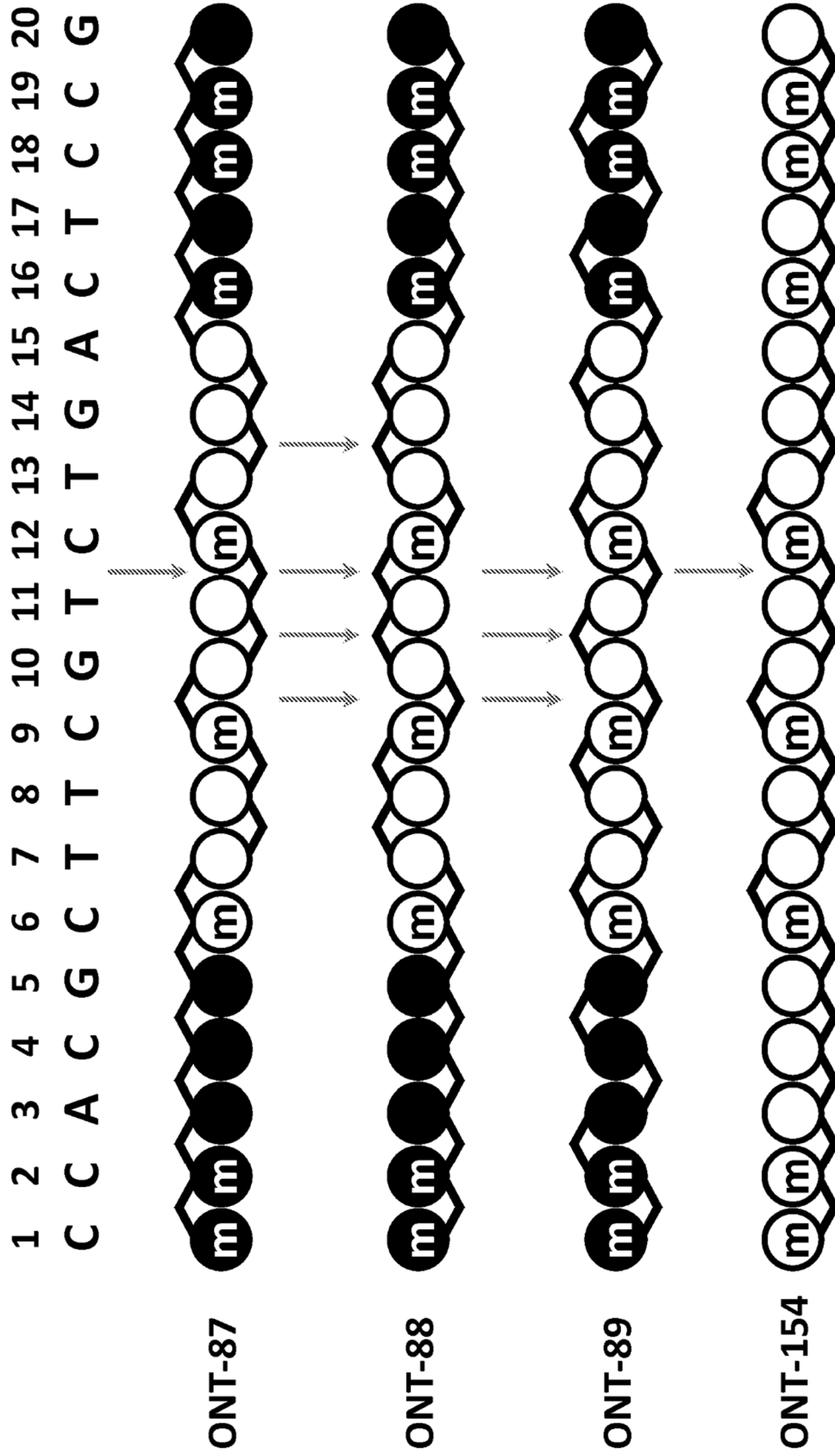
(PANEL A)

FIG. 9

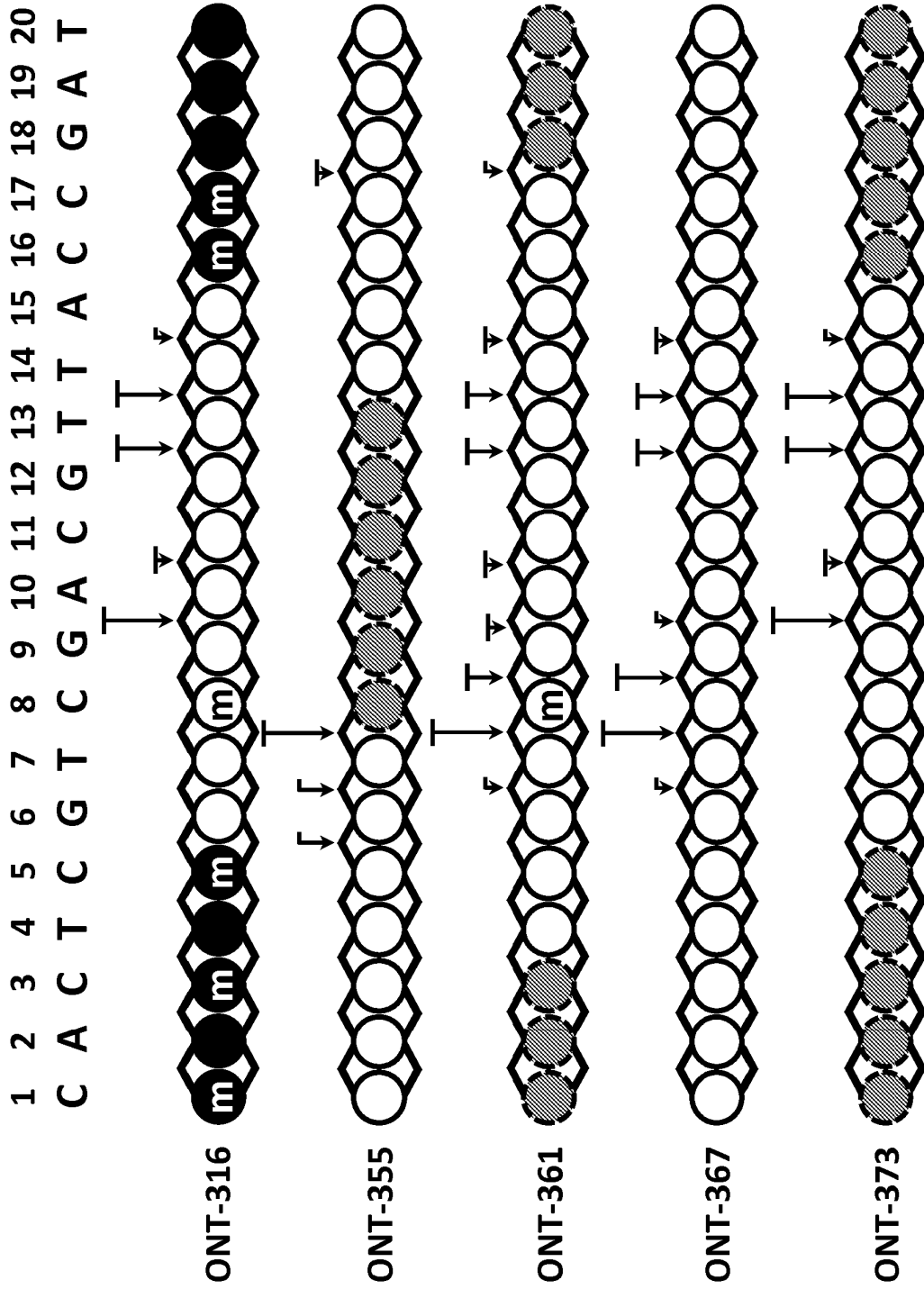


(PANEL B)

FIG. 9 (CONTINUACIÓN)

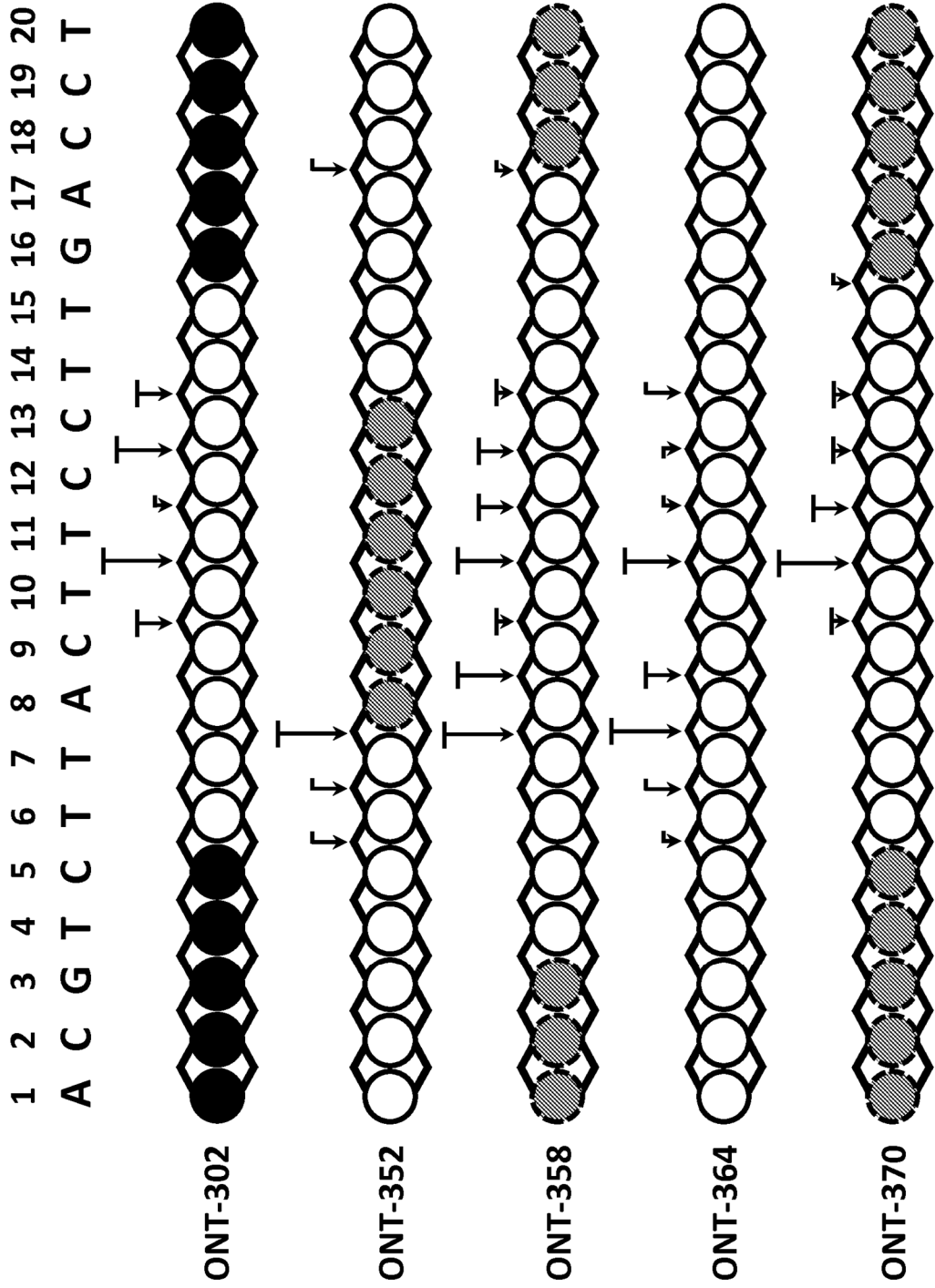


(PANEL C)  
FIG. 9 (CONTINUACIÓN)



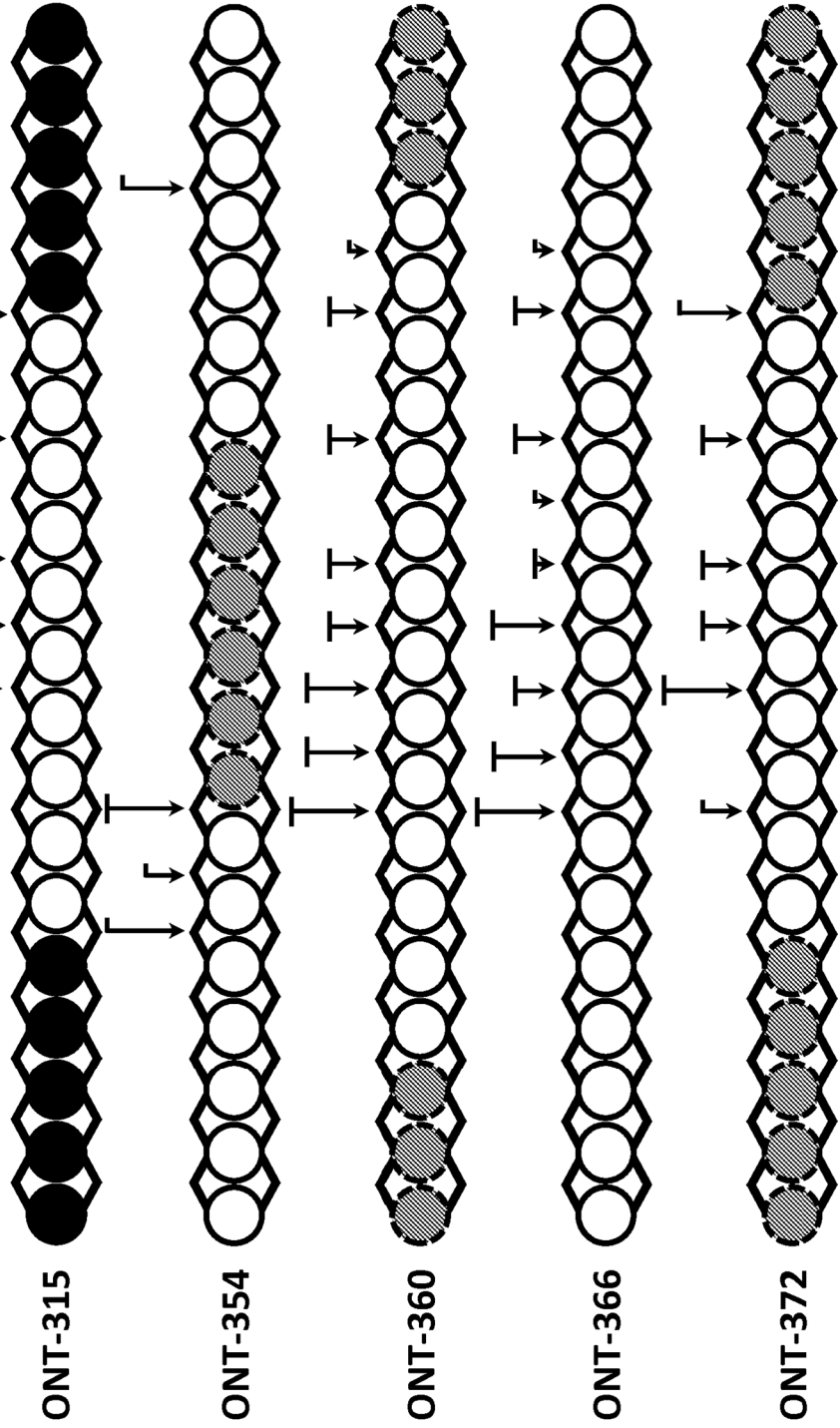
(PANEL A)

FIG. 10

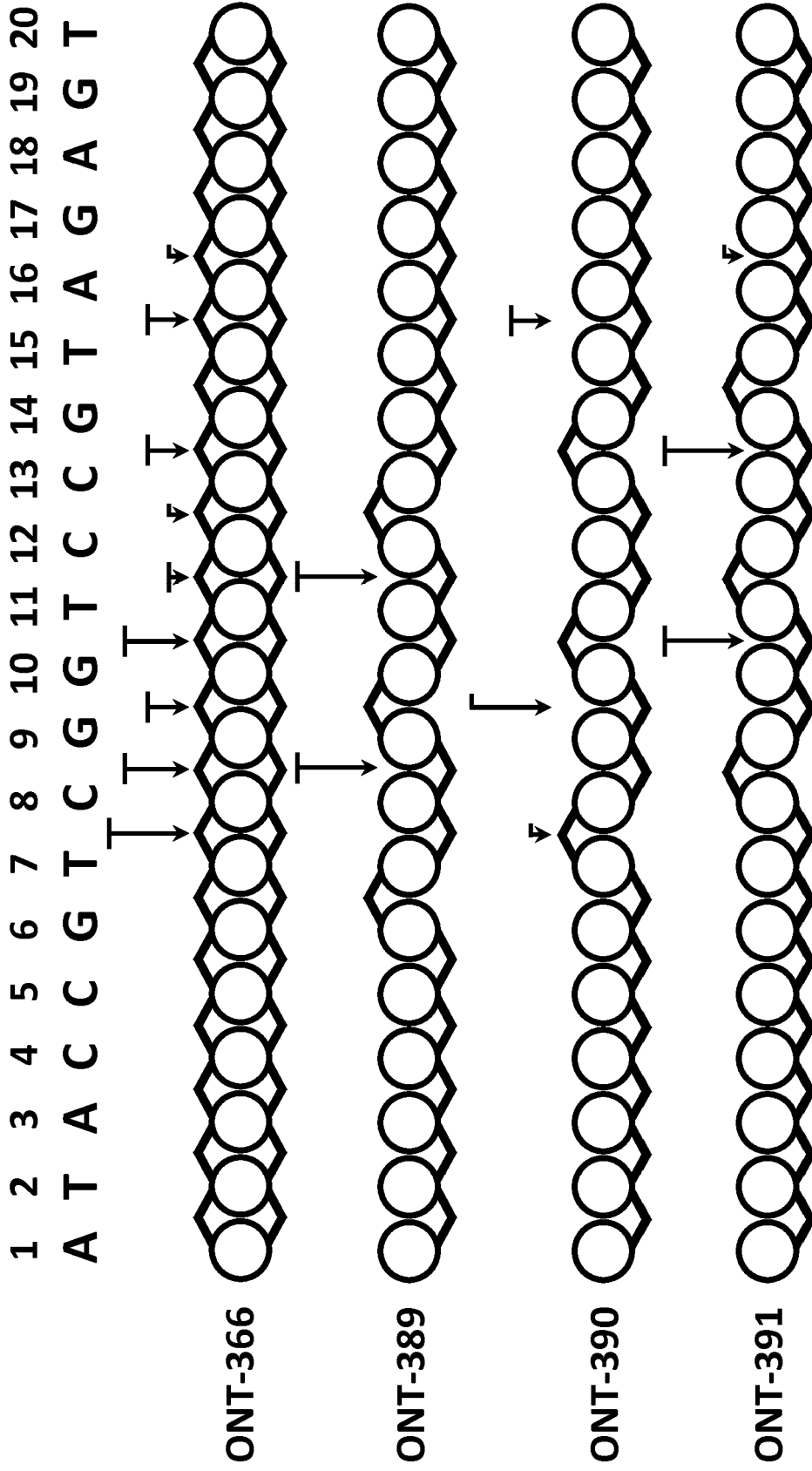


(PANEL B)  
FIG. 10 (CONTINUACIÓN)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
A T A C C G T C G G T C C G T A G A G T



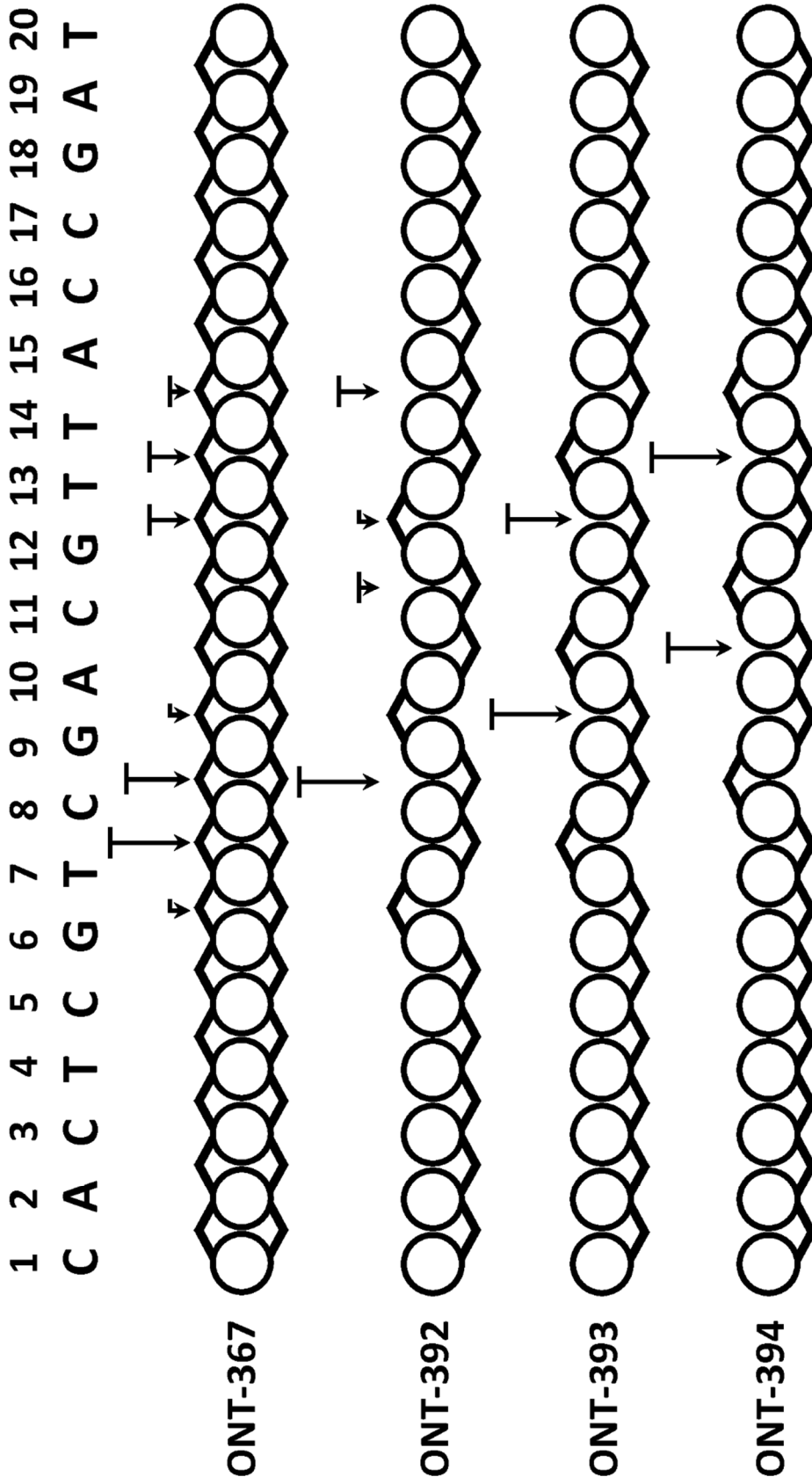
(PANEL C)  
FIG. 10 (CONTINUACIÓN)



(PANEL A)

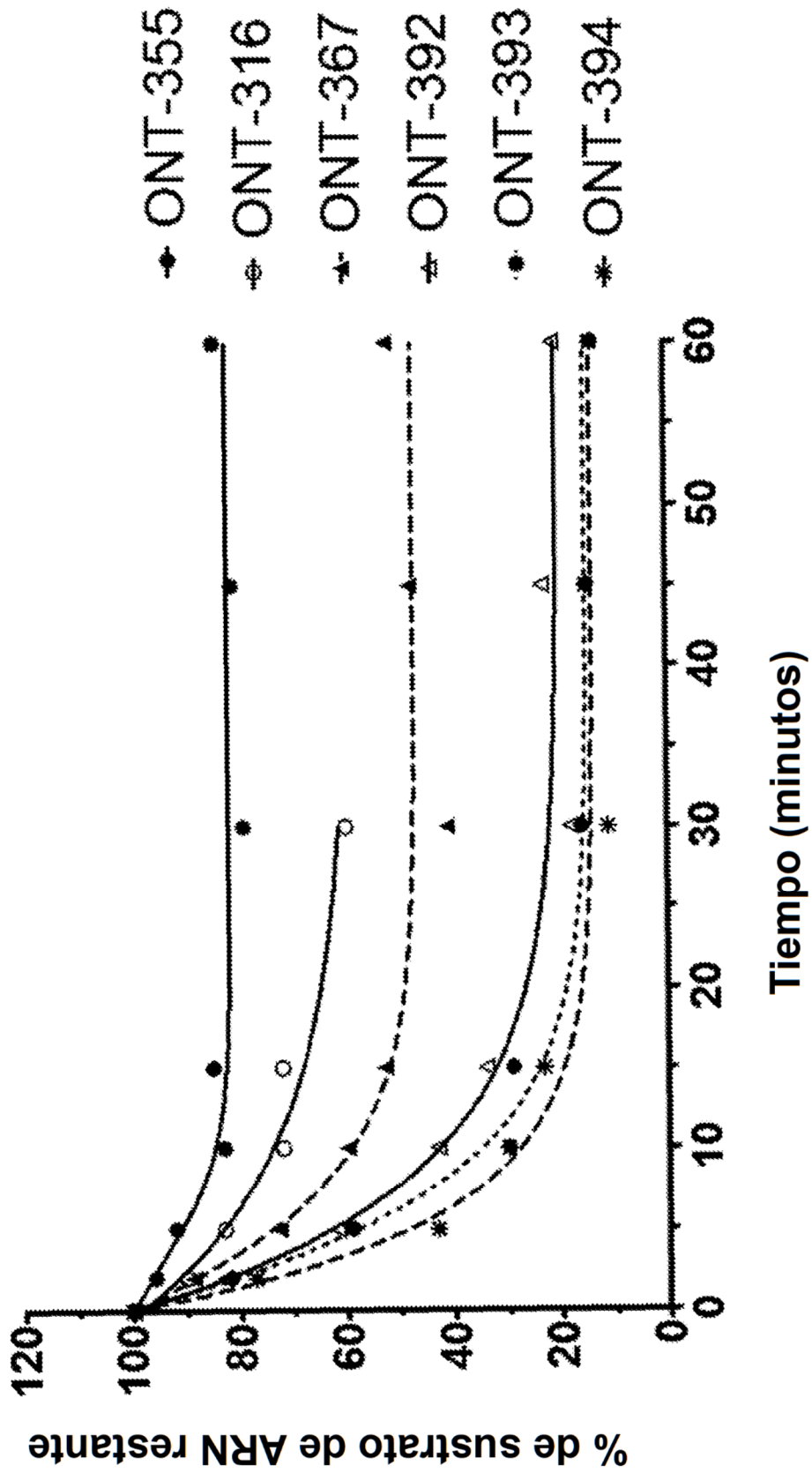
FIG. 11





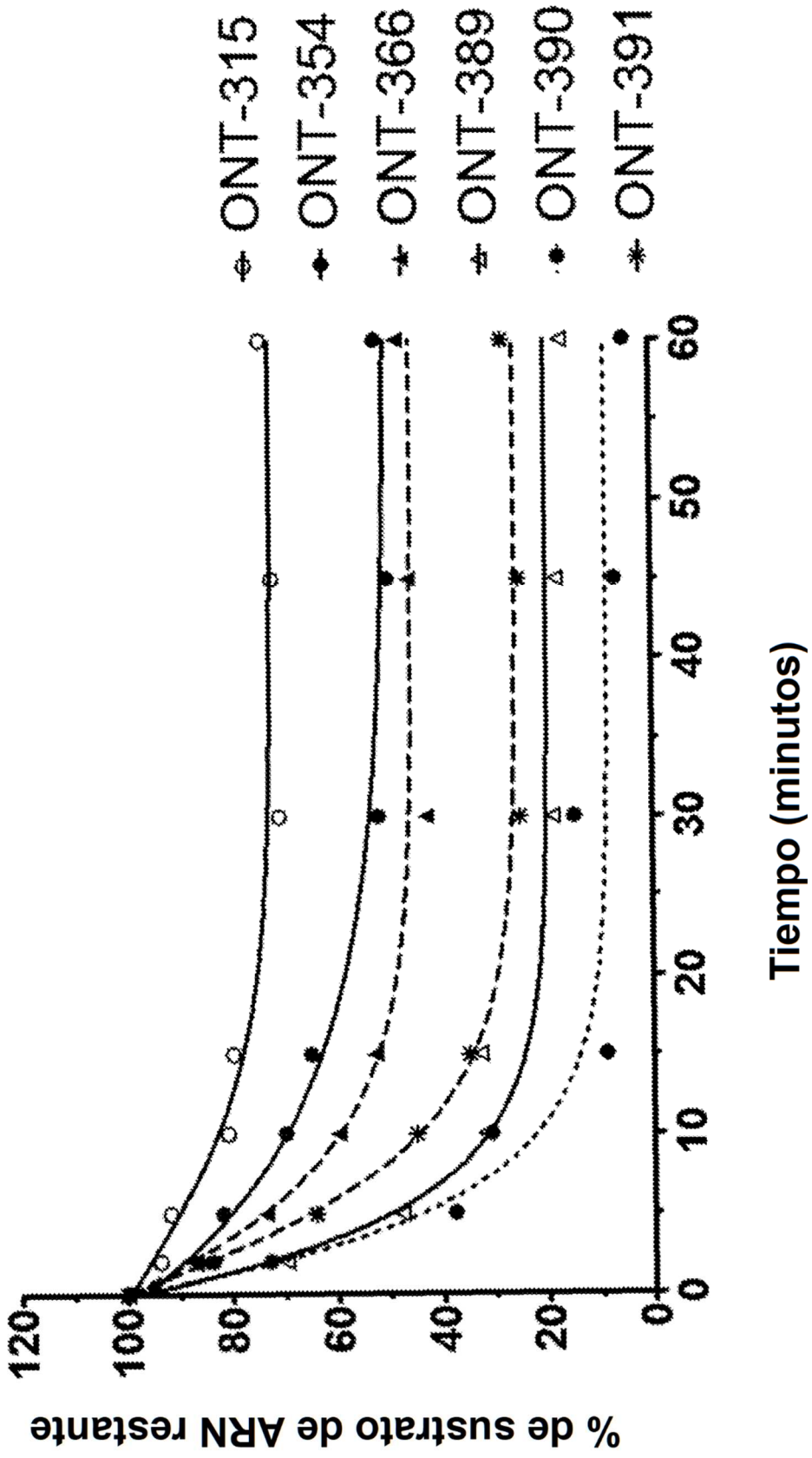
(PANEL B)

FIG. 11 (CONTINUACIÓN)



(PANEL A)

FIG. 12



(PANEL B)

FIG. 12 (CONTINUACIÓN)

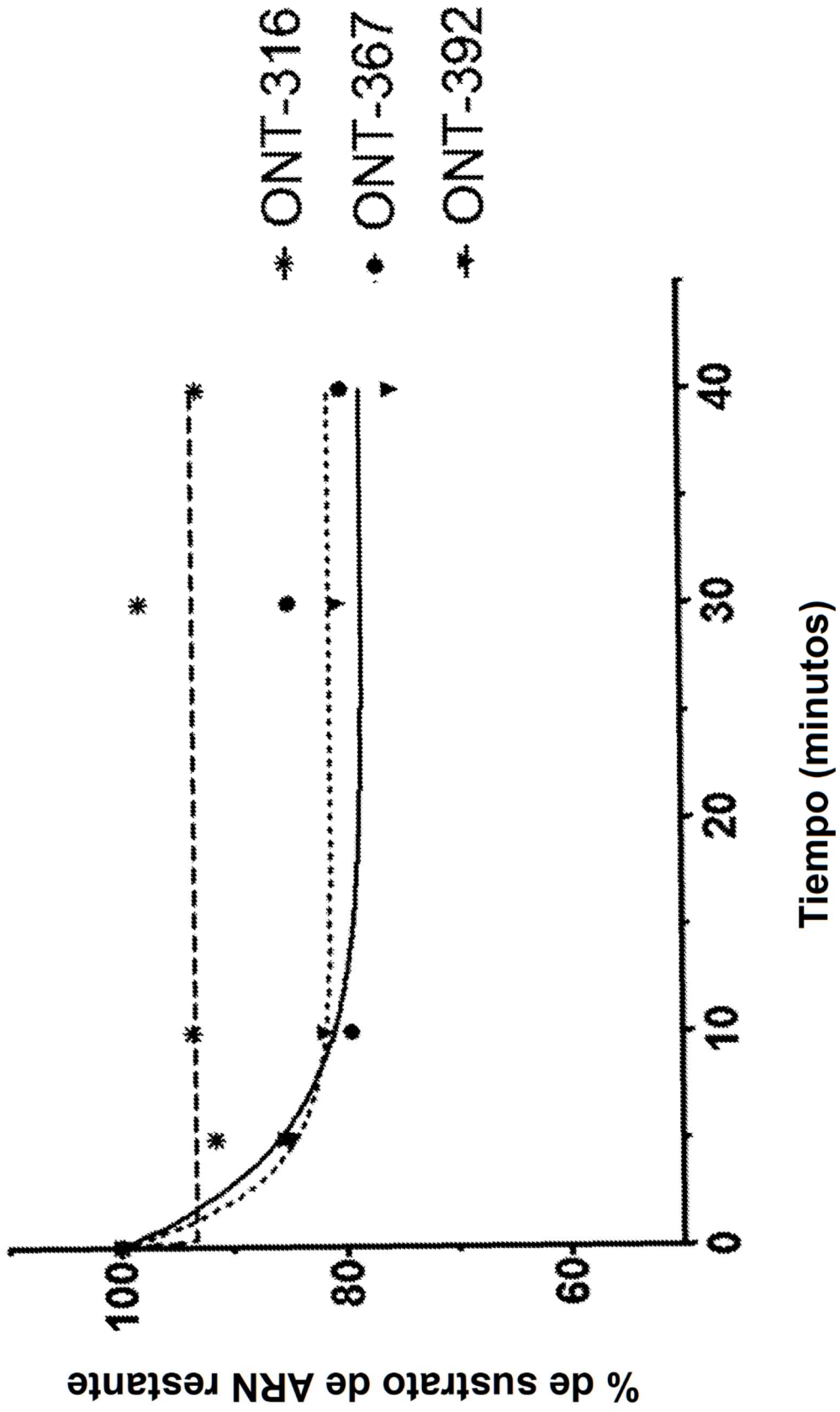


FIG. 13

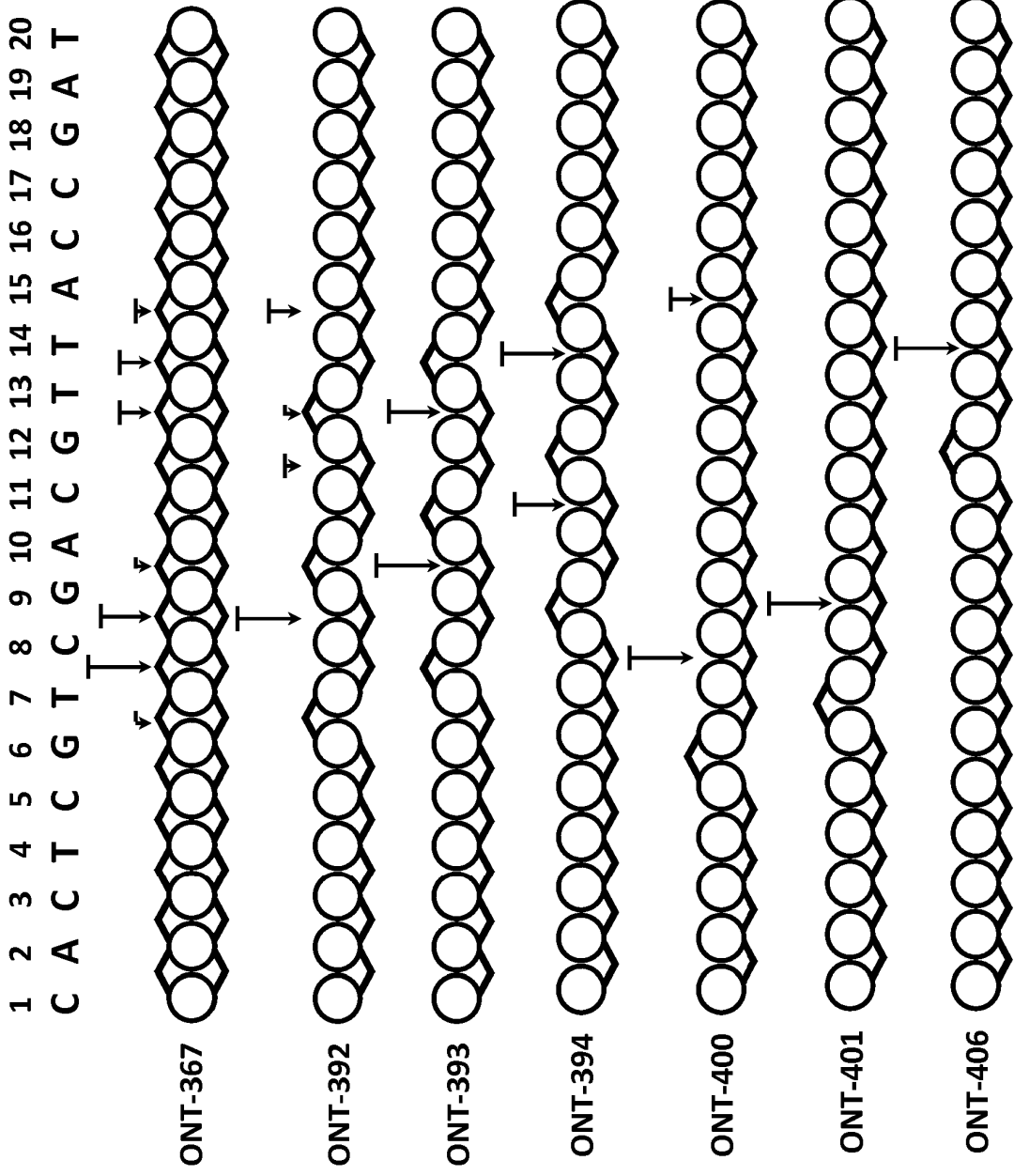


FIG. 14

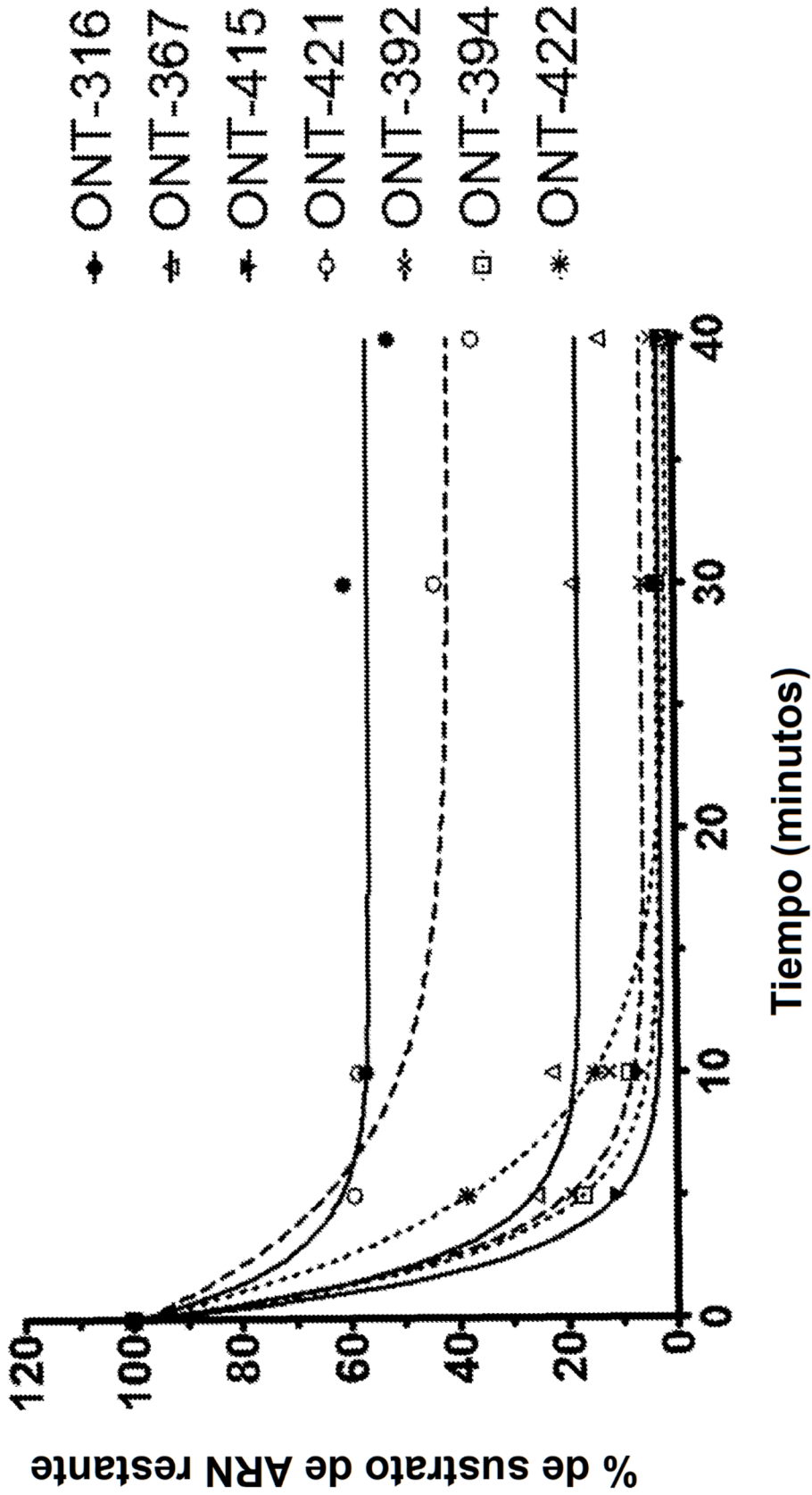


FIG. 15

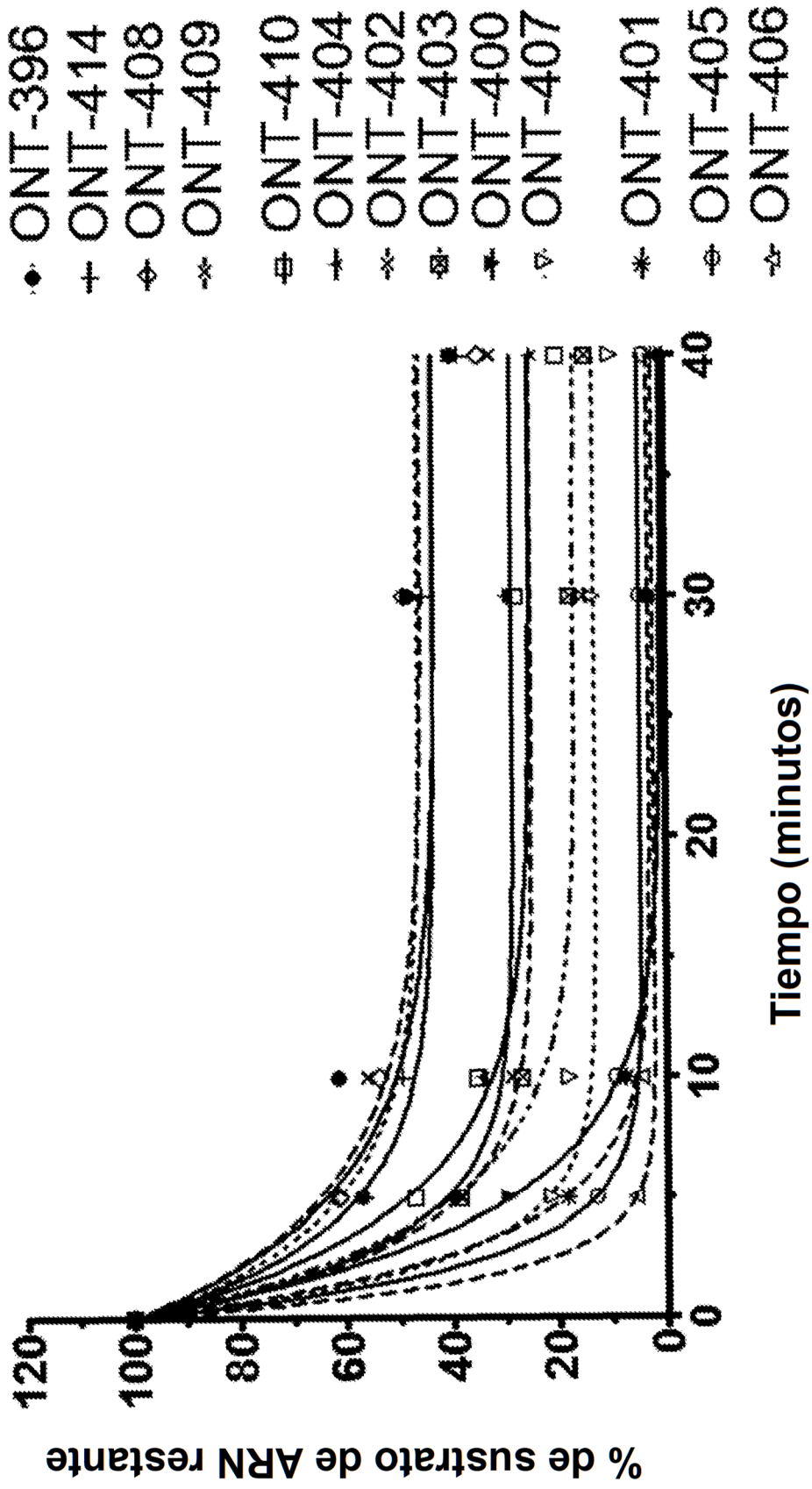


FIG. 16

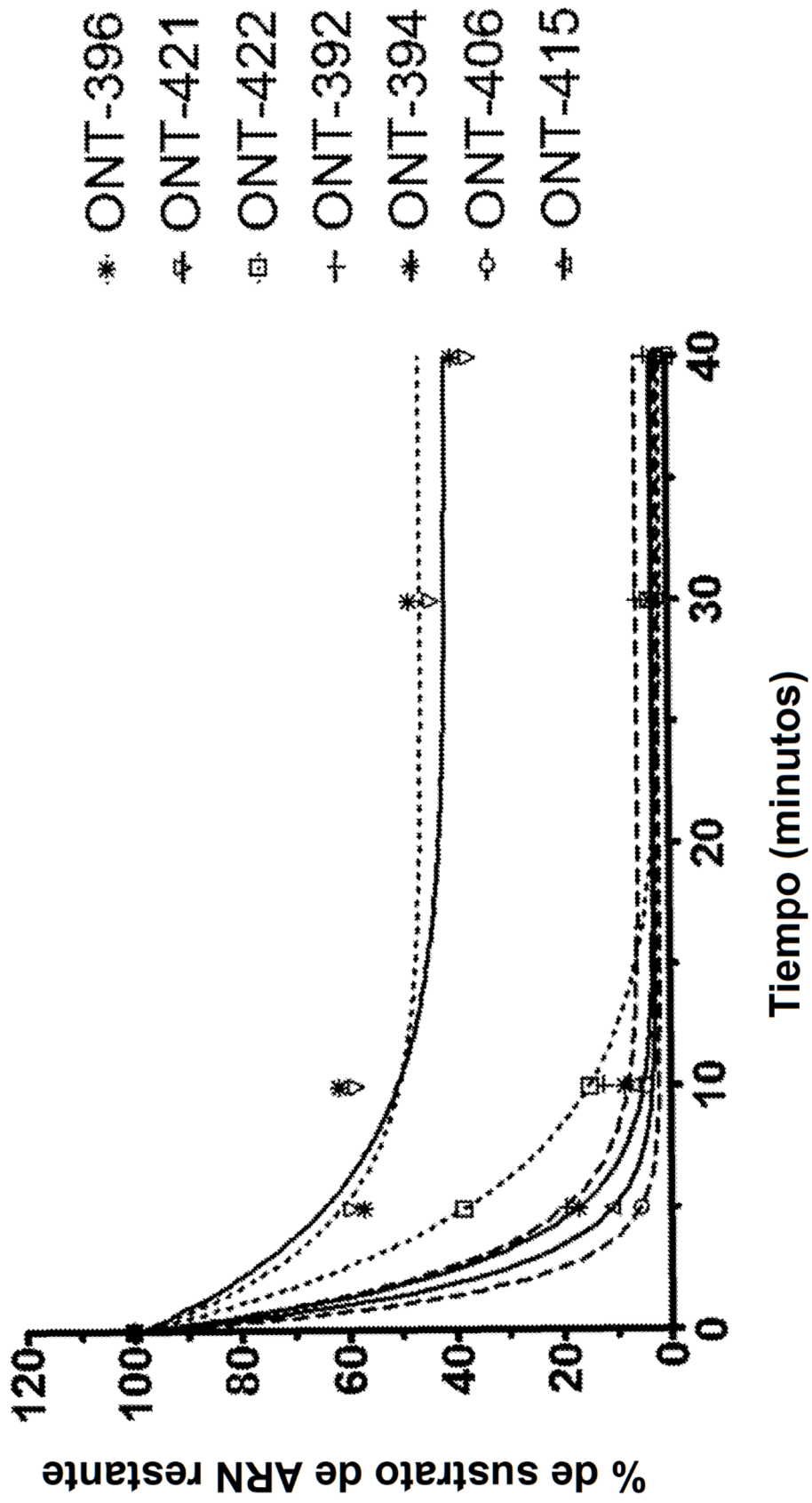


FIG. 17



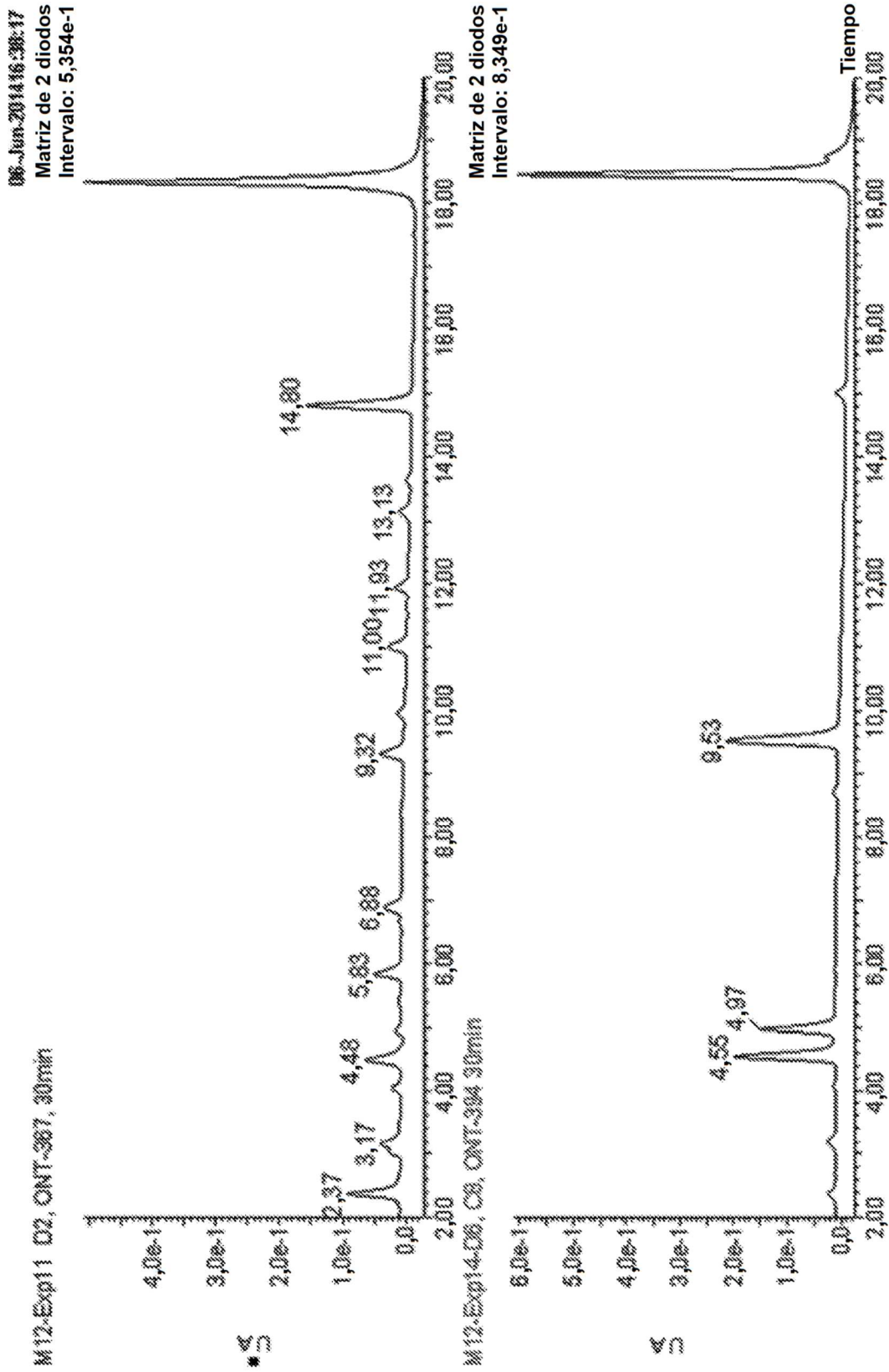


FIG. 18

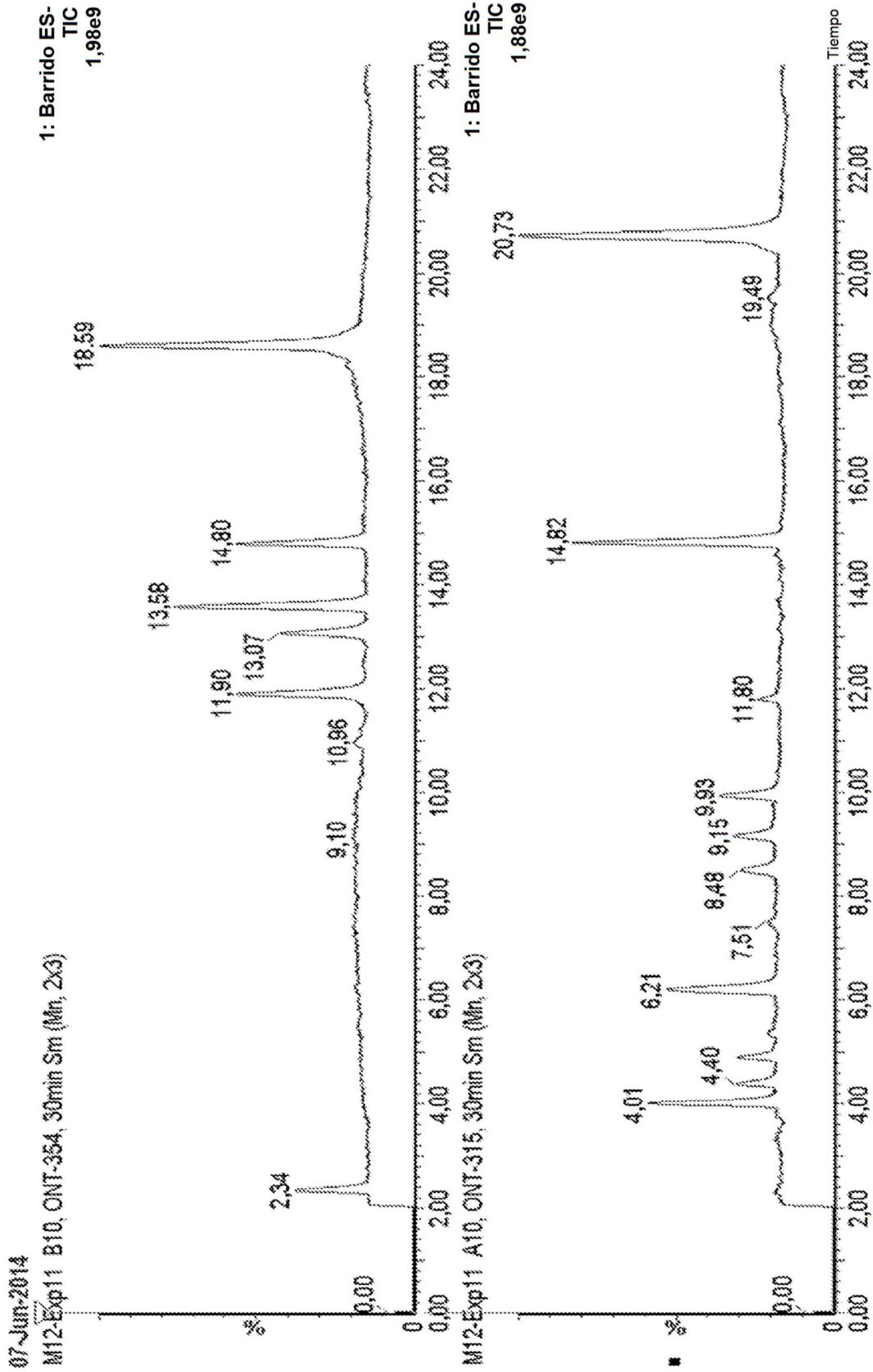


FIG. 19

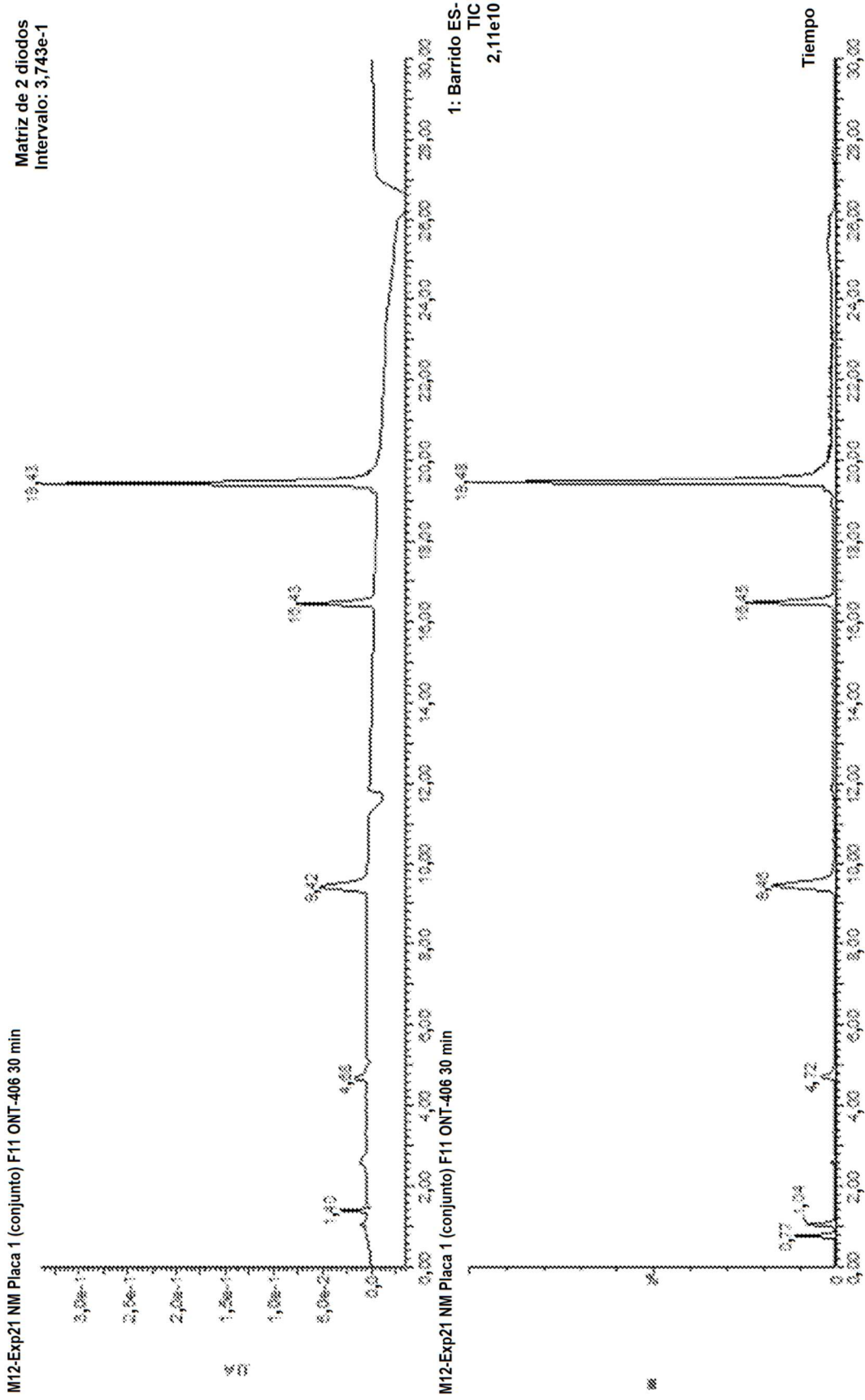


FIG. 20

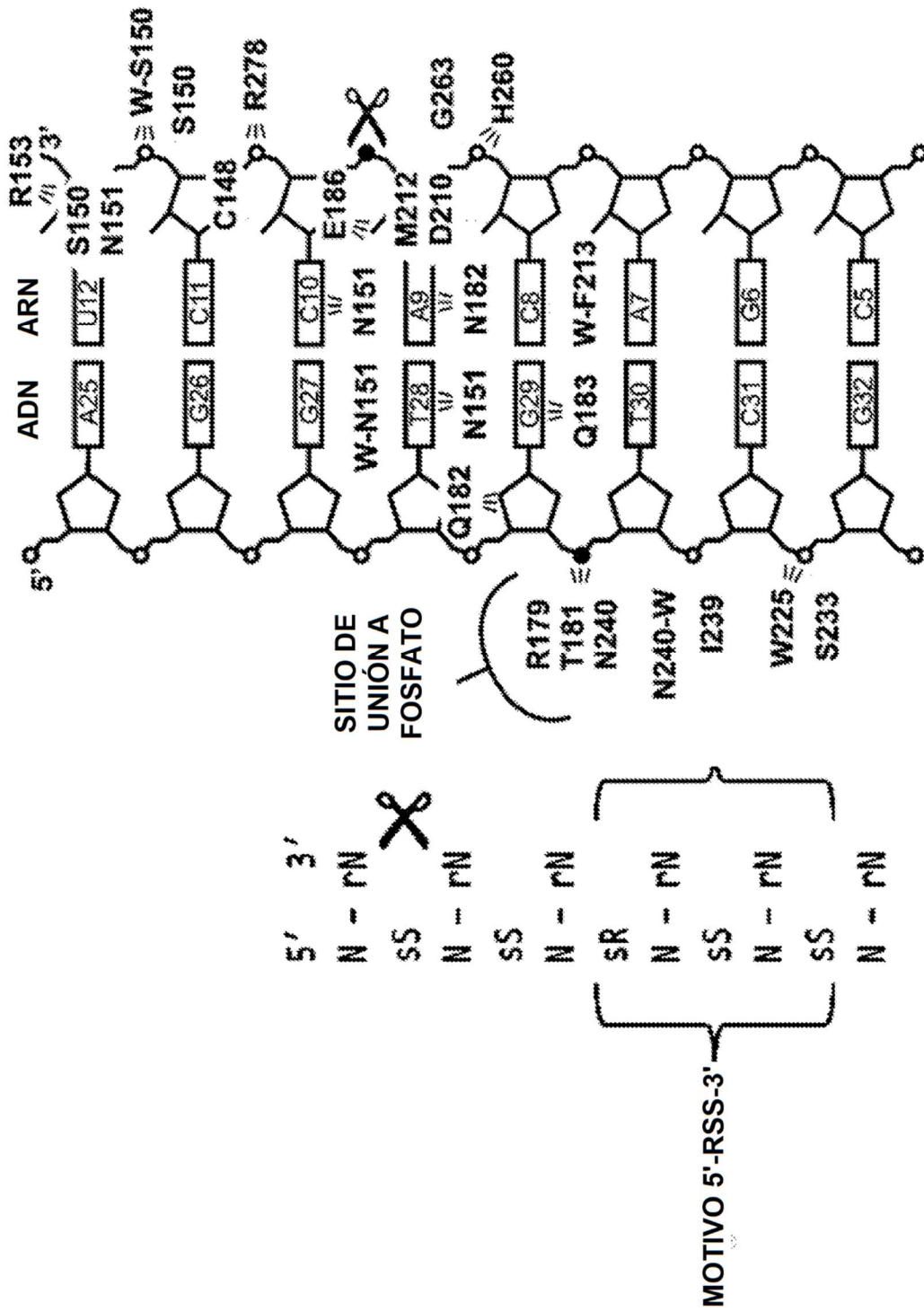
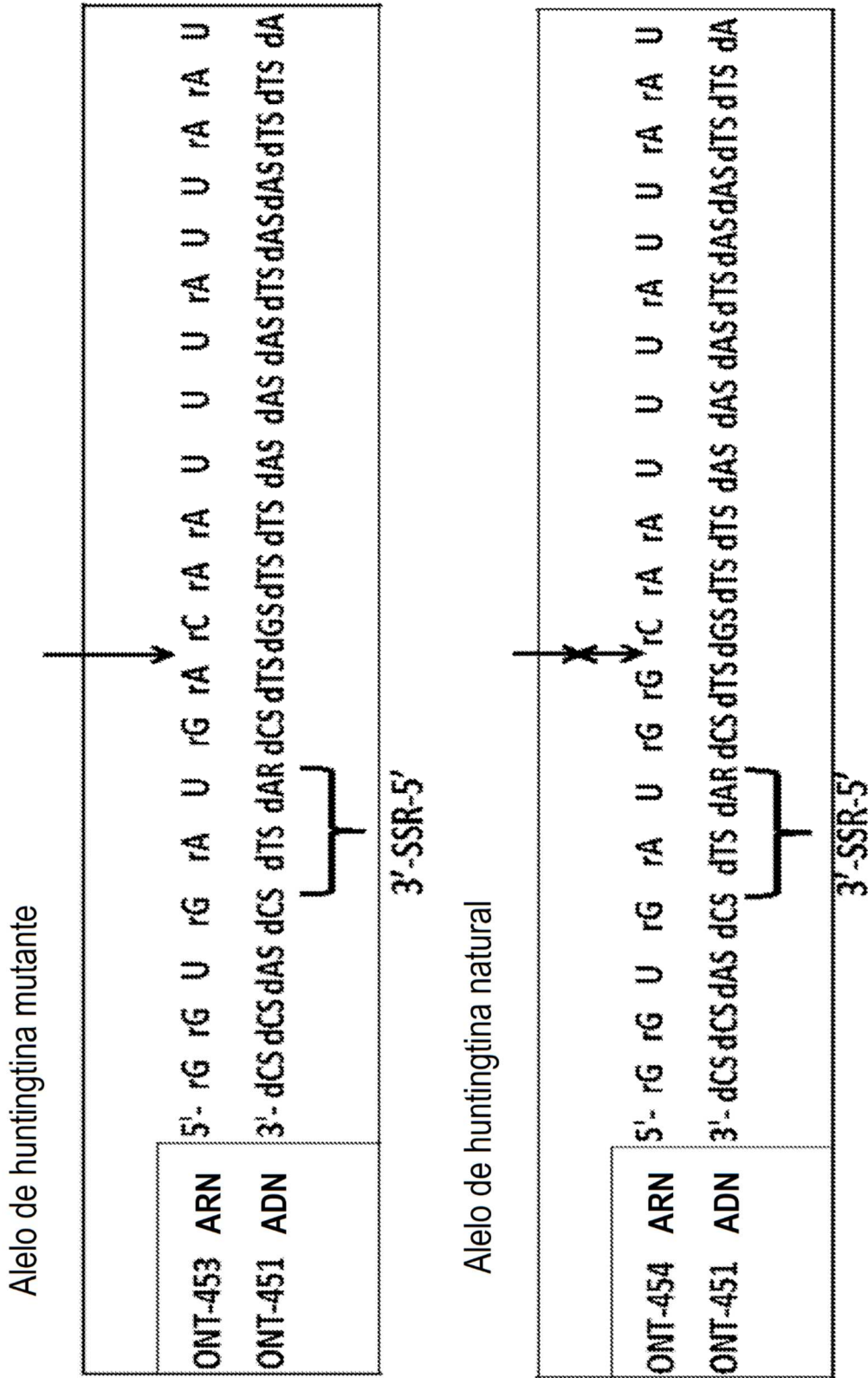


FIG. 21



(PANEL A)

FIG. 22

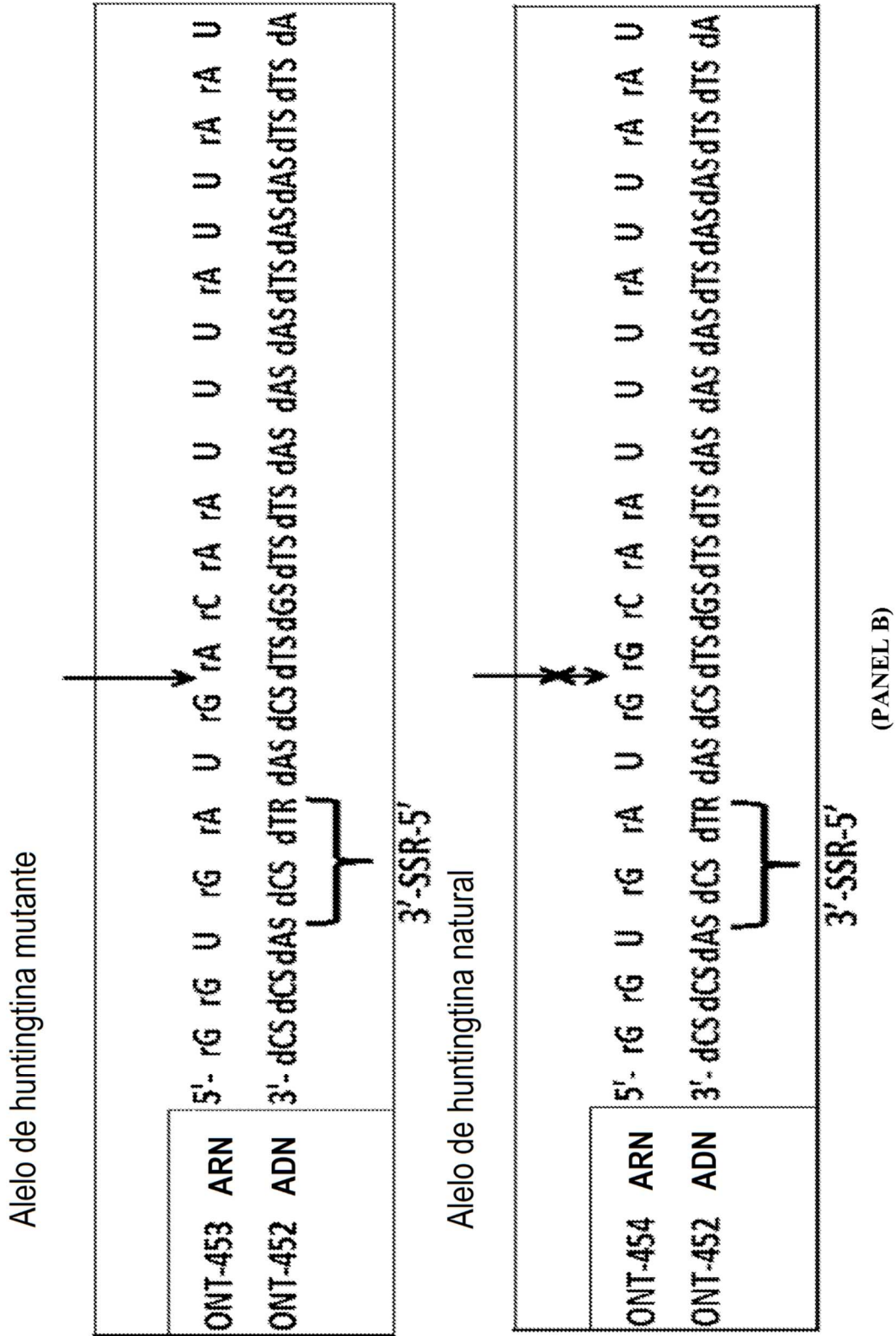
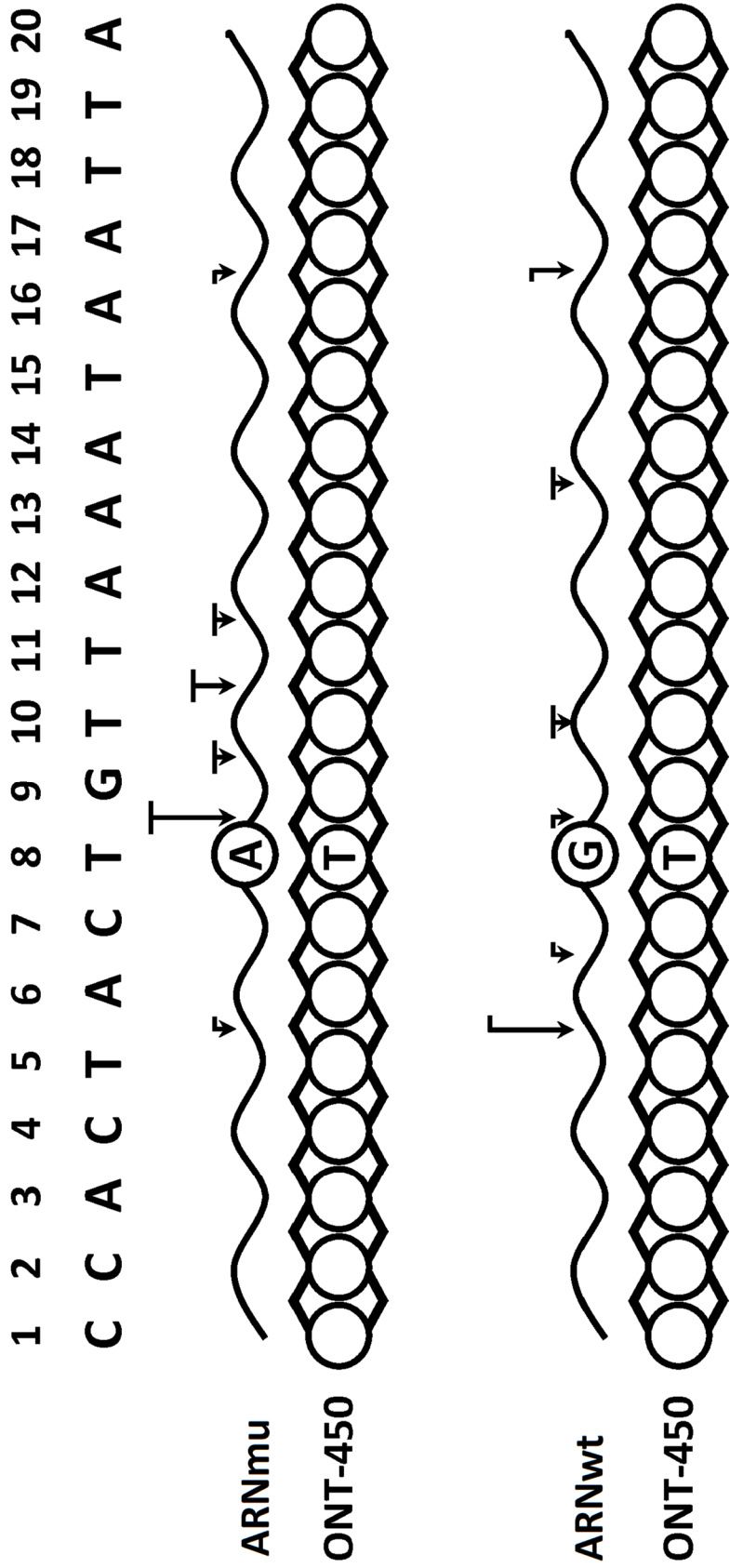


FIG. 22 (CONTINUACIÓN)

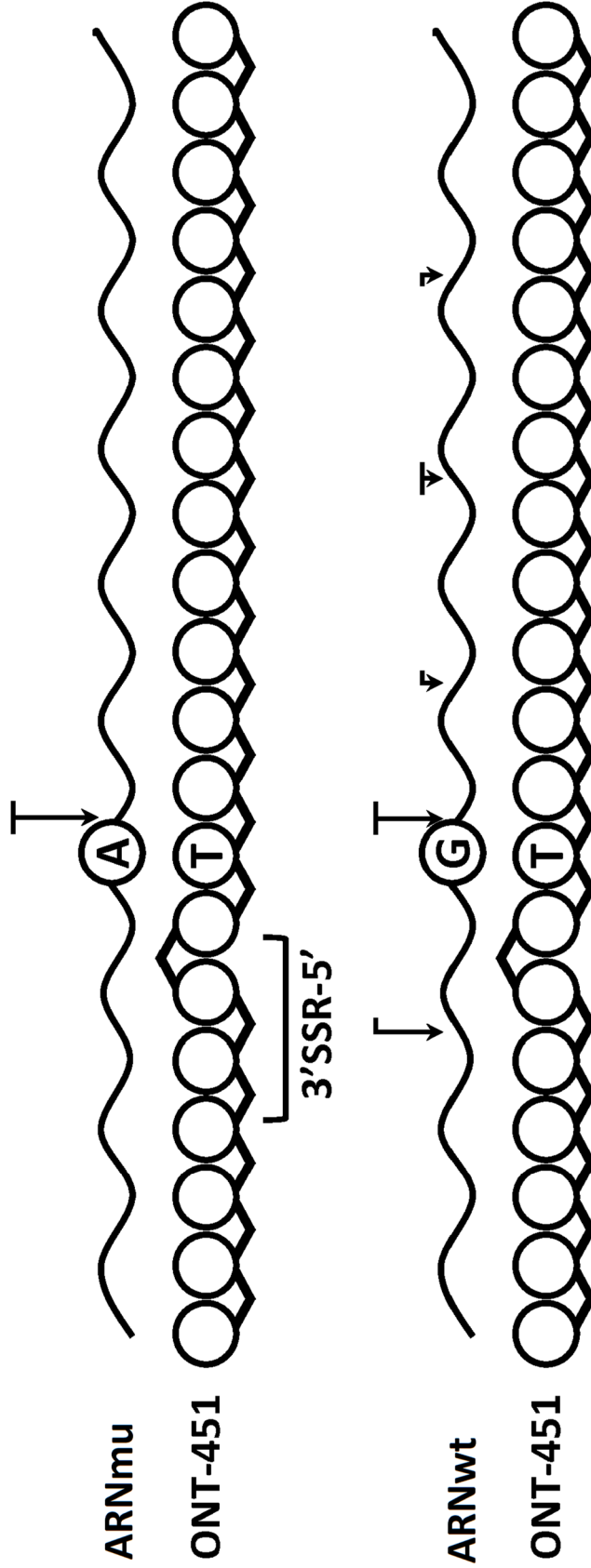




(PANEL C)

FIG. 22 (CONTINUACIÓN)

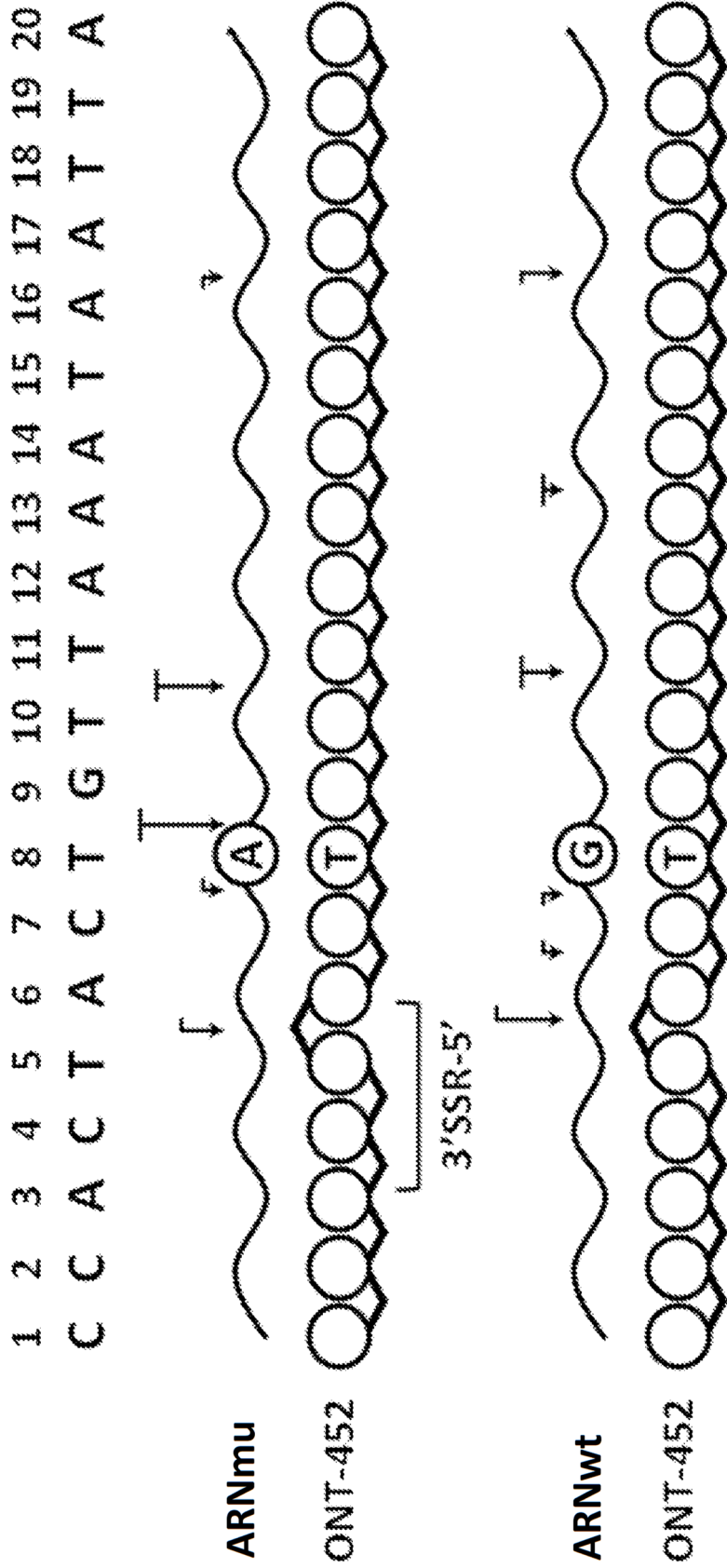
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
 C C A C T A C T G T T A A A T A A T T A



(PANEL D)

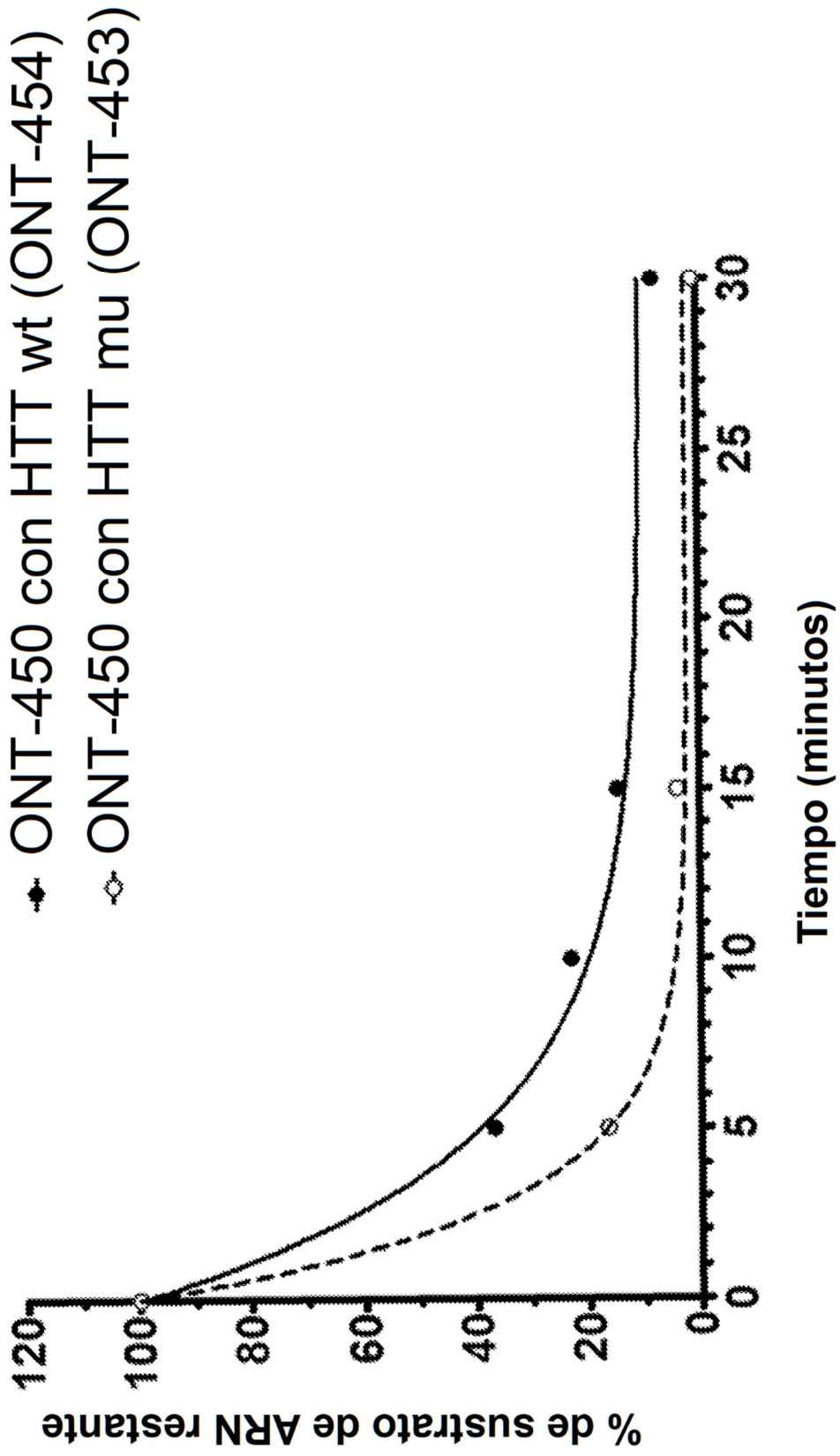
FIG. 22 (CONTINUACIÓN)





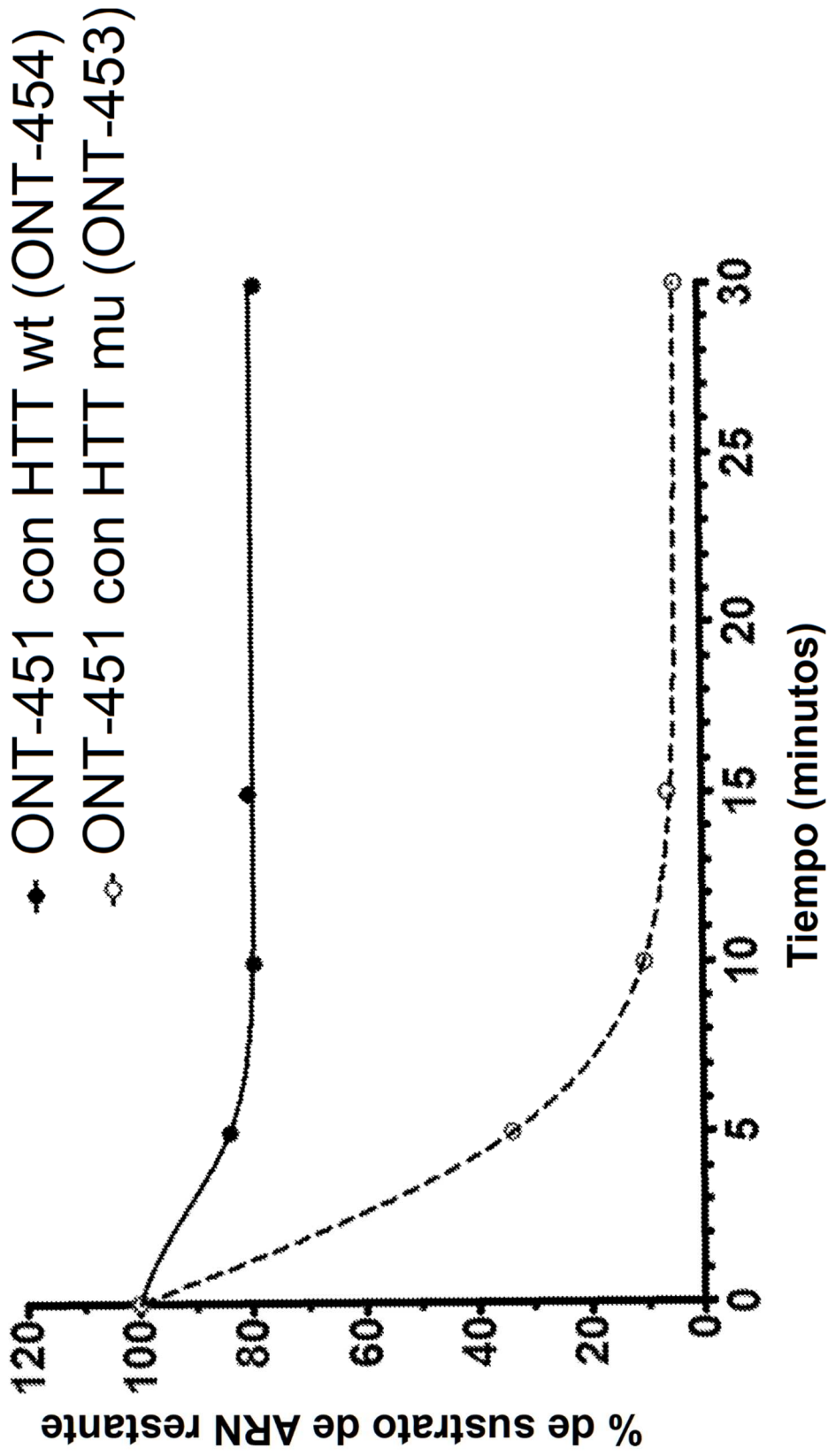
(PANEL E)

FIG. 22 (CONTINUACIÓN)



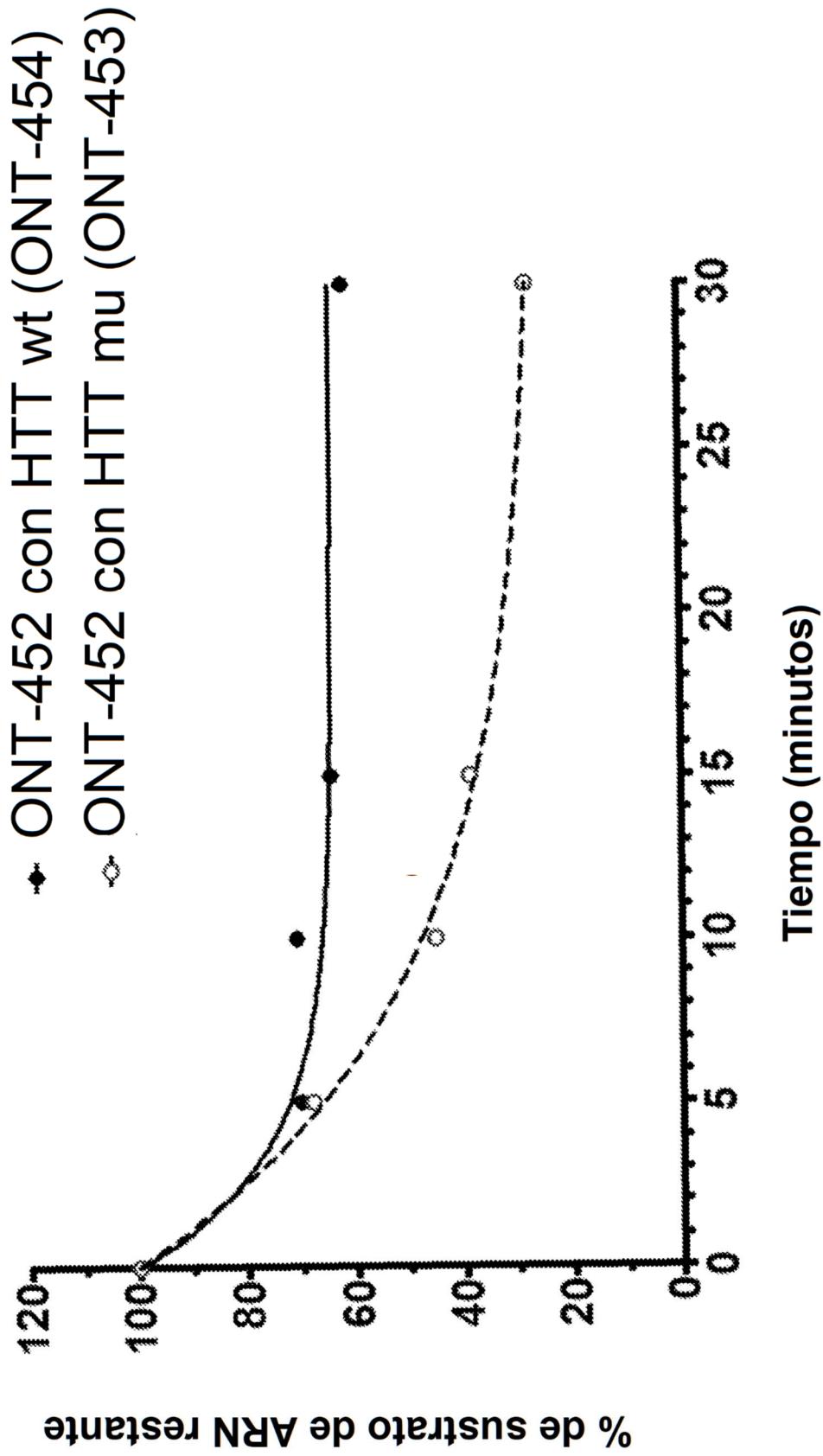
(PANEL F)

FIG. 22 (CONTINUACIÓN)



(PANEL G)

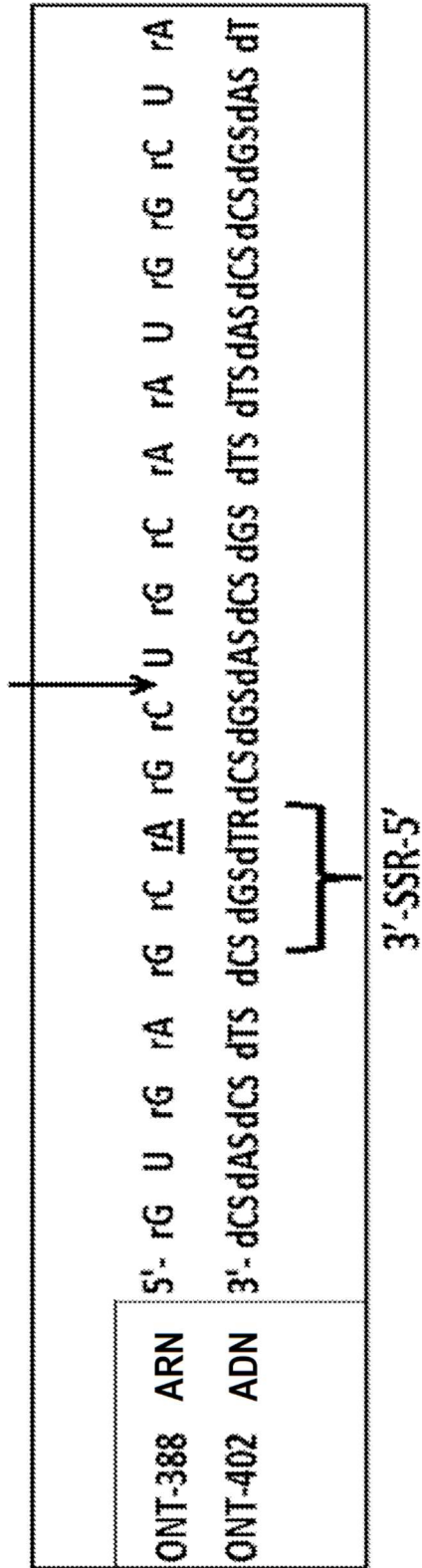
FIG. 22 (CONTINUACIÓN)



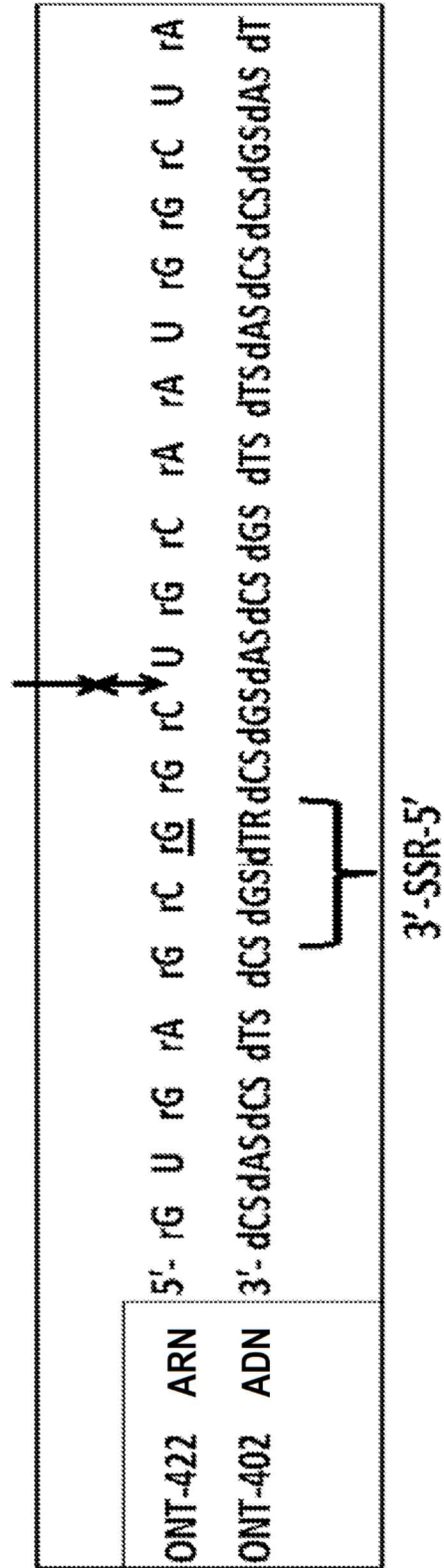
(PANEL H)

FIG. 22 (CONTINUACIÓN)

Alelo mutante representativo

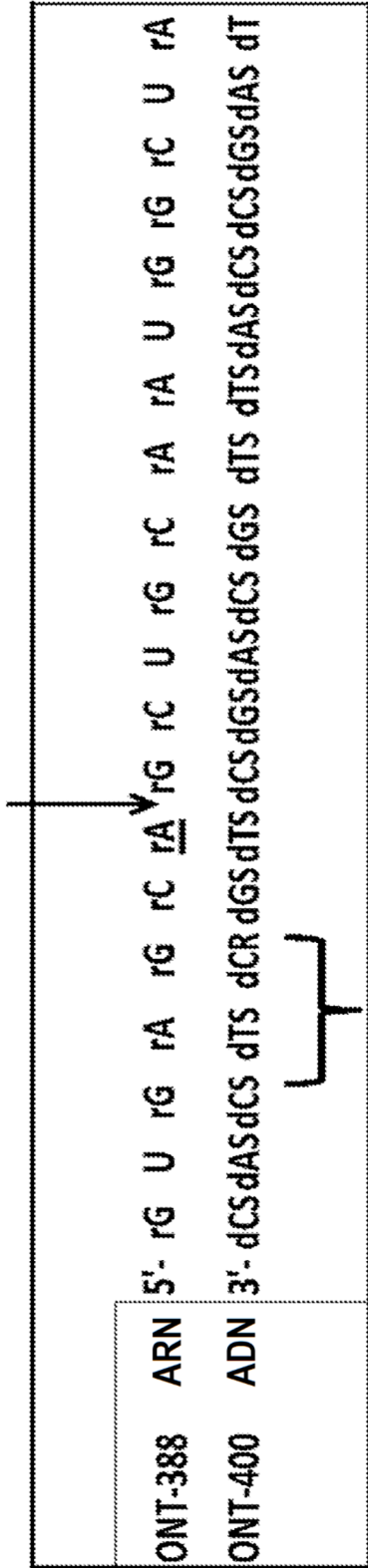


Alelo natural representativo

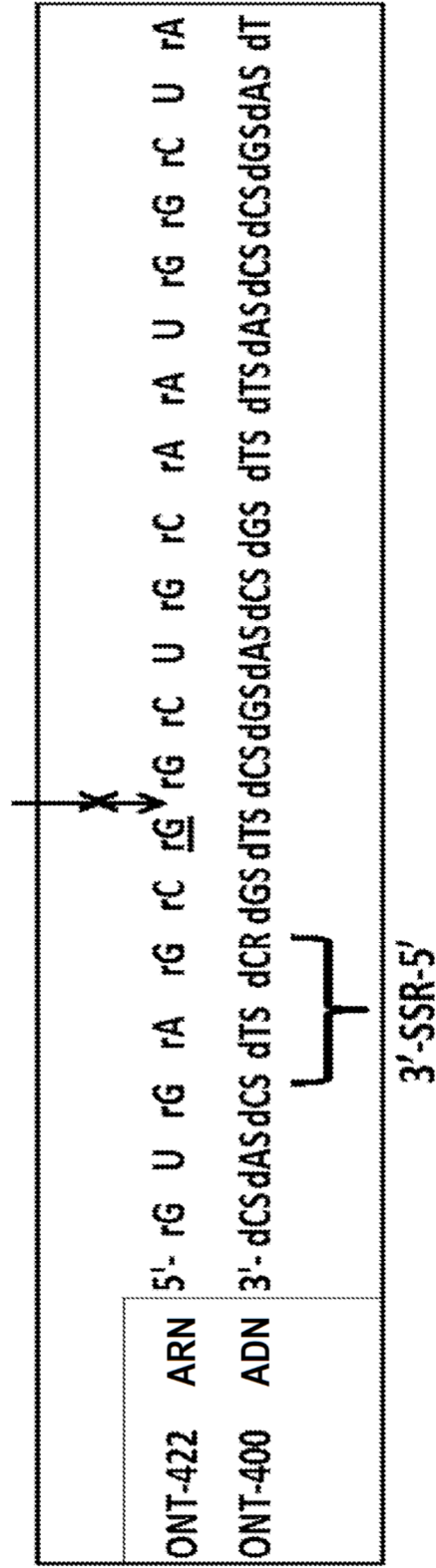


(PANEL A)  
FIG. 23

**Alelo mutante representativo**



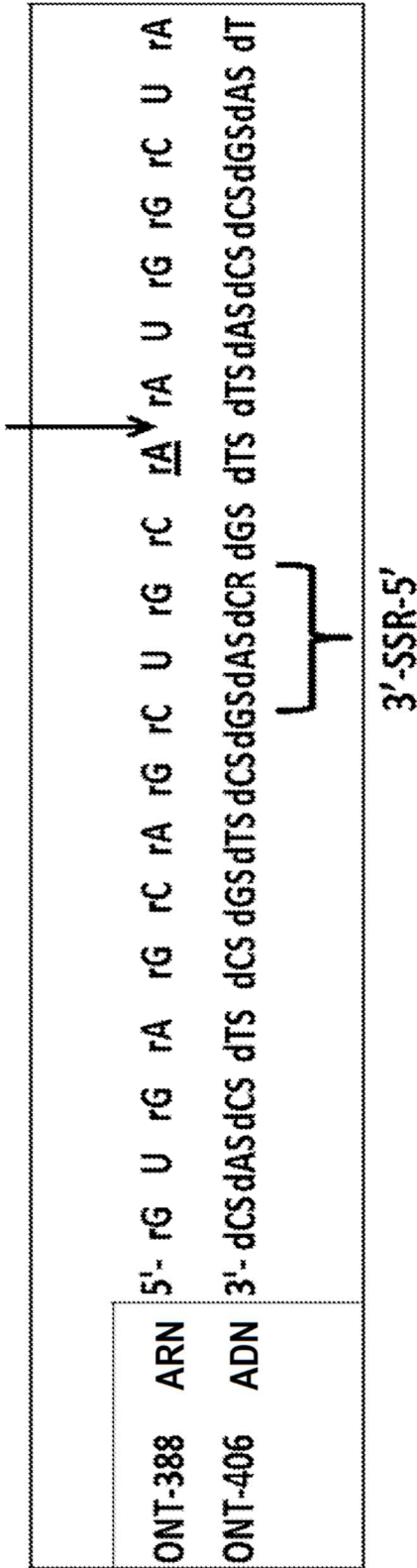
**Alelo natural representativo**



(PANEL B)

FIG. 23 (CONTINUACIÓN)

**Alelo mutante representativo**



**Alelo natural representativo**

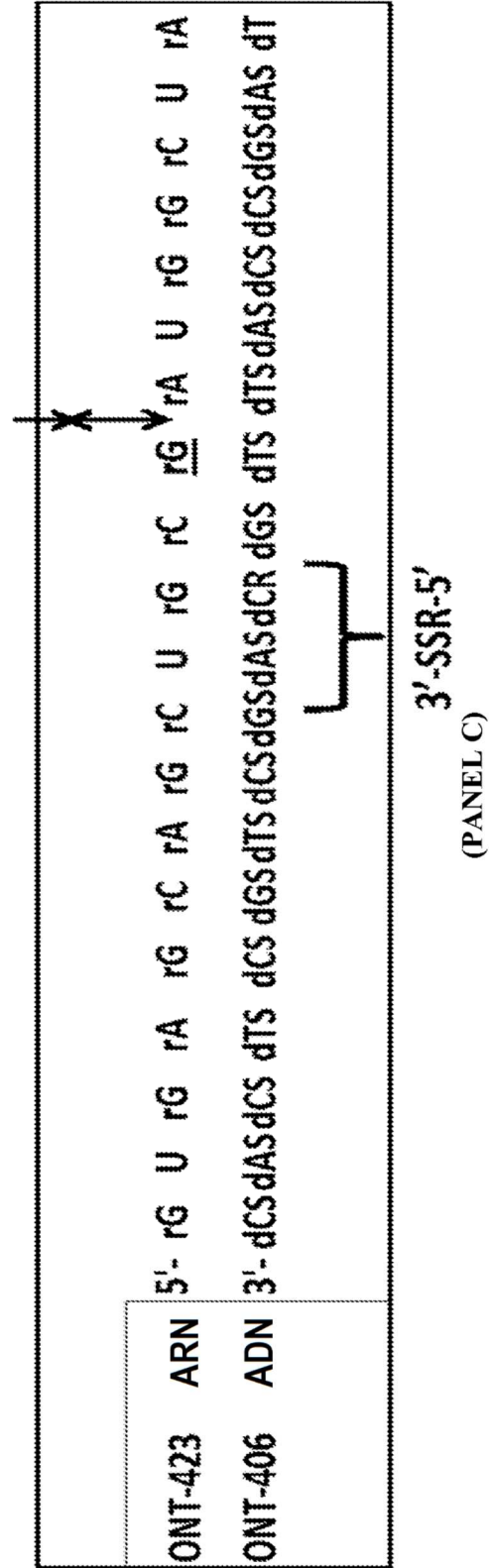


FIG. 23 (CONTINUACIÓN)

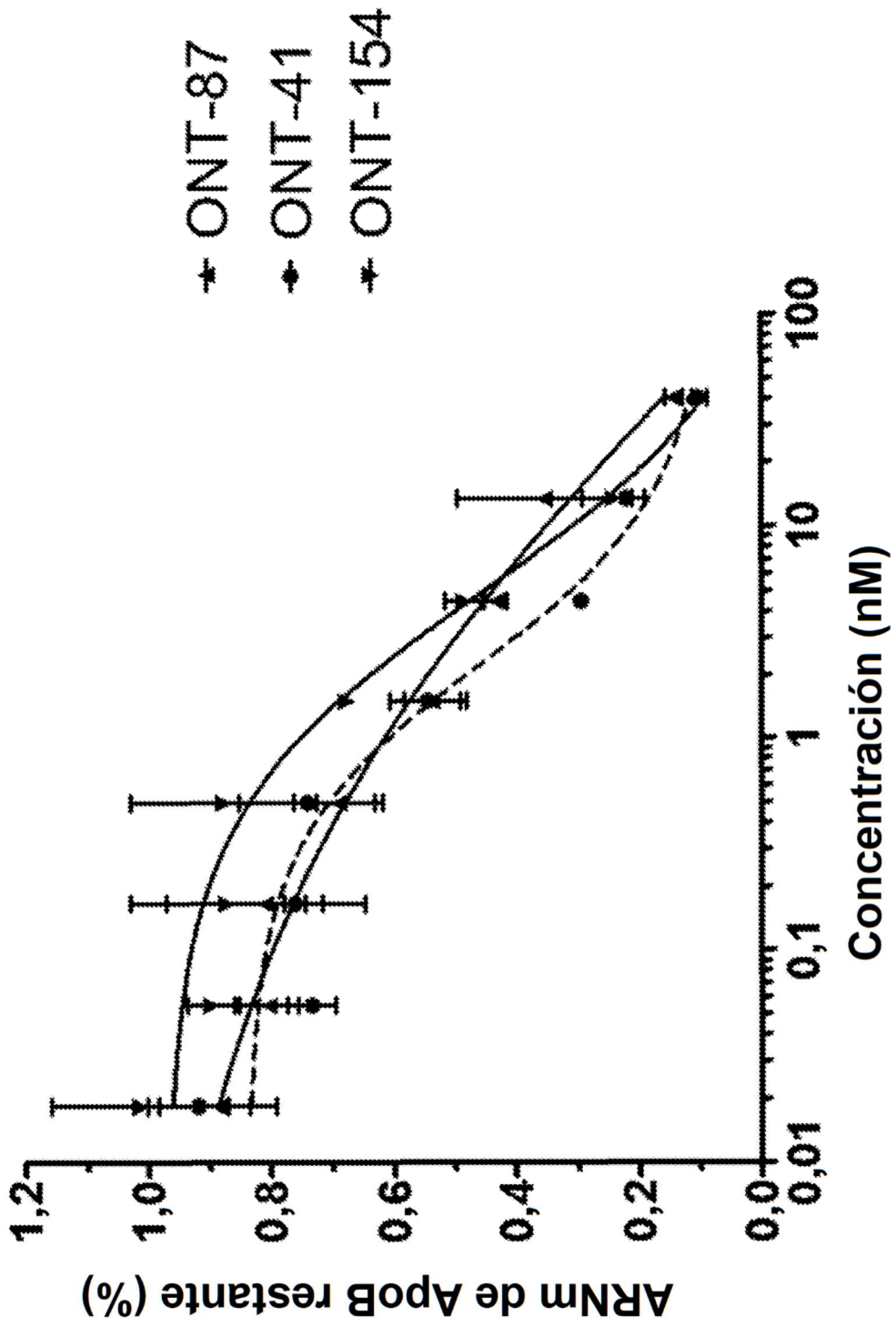
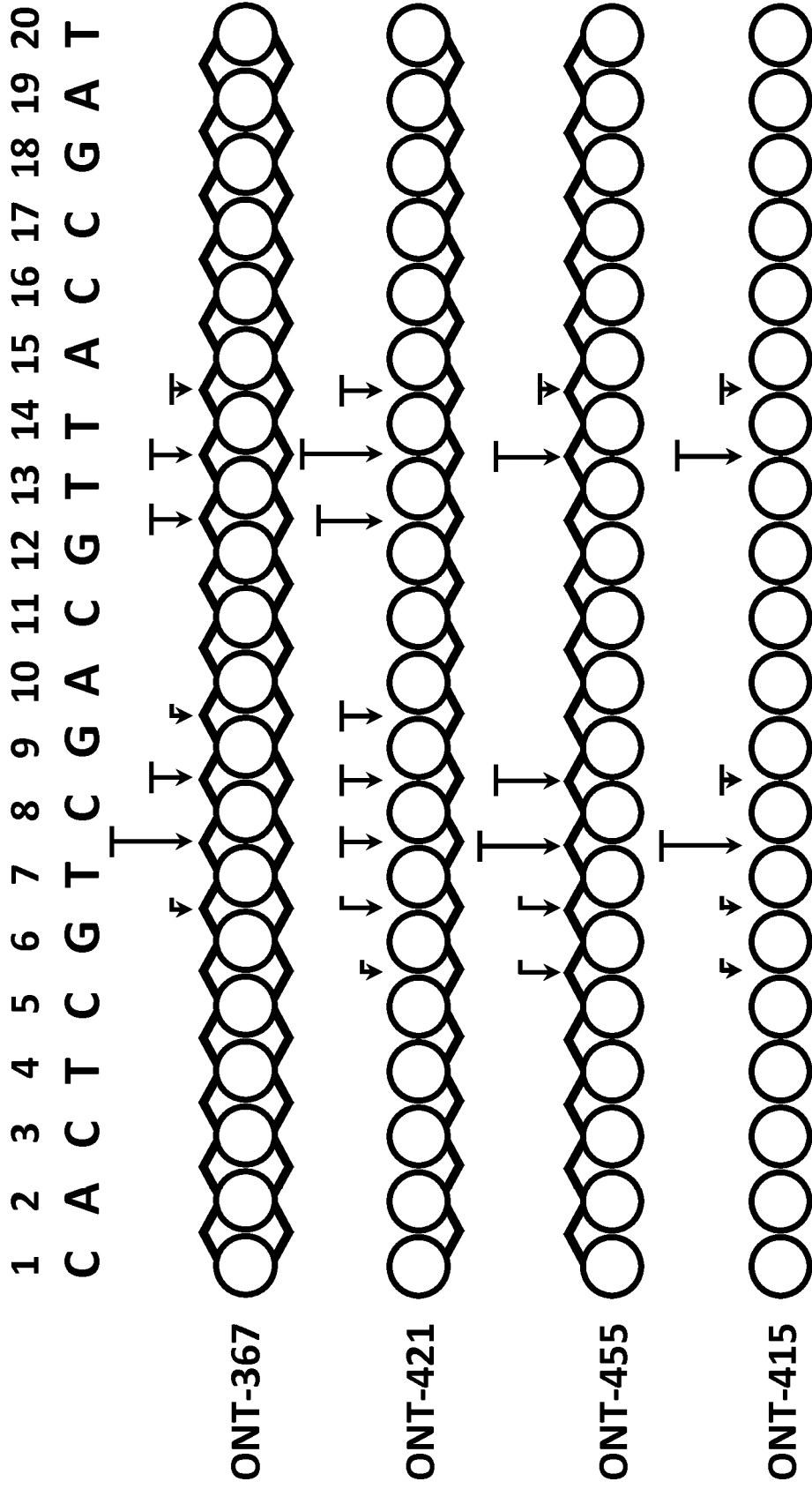


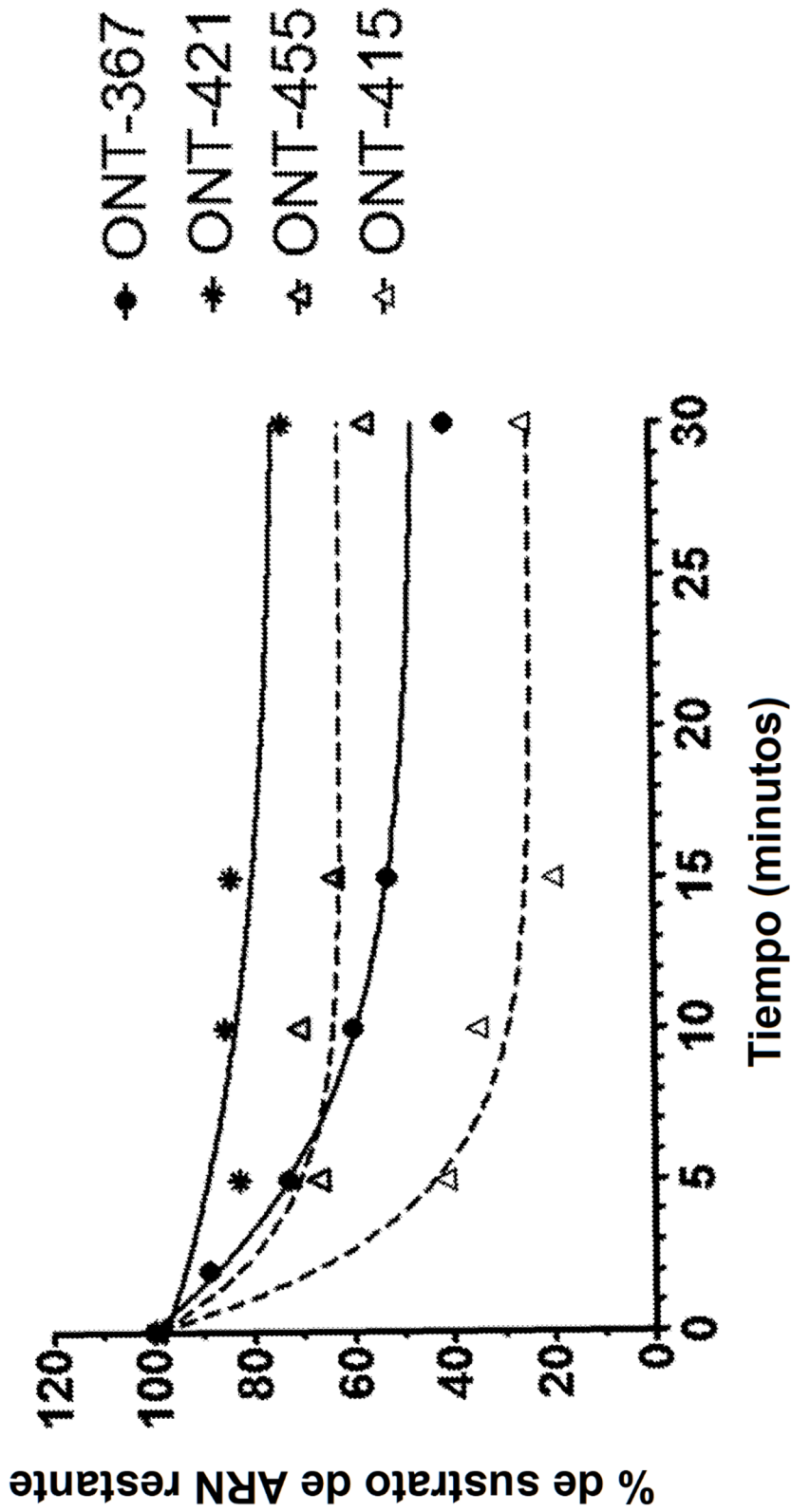
FIG. 24





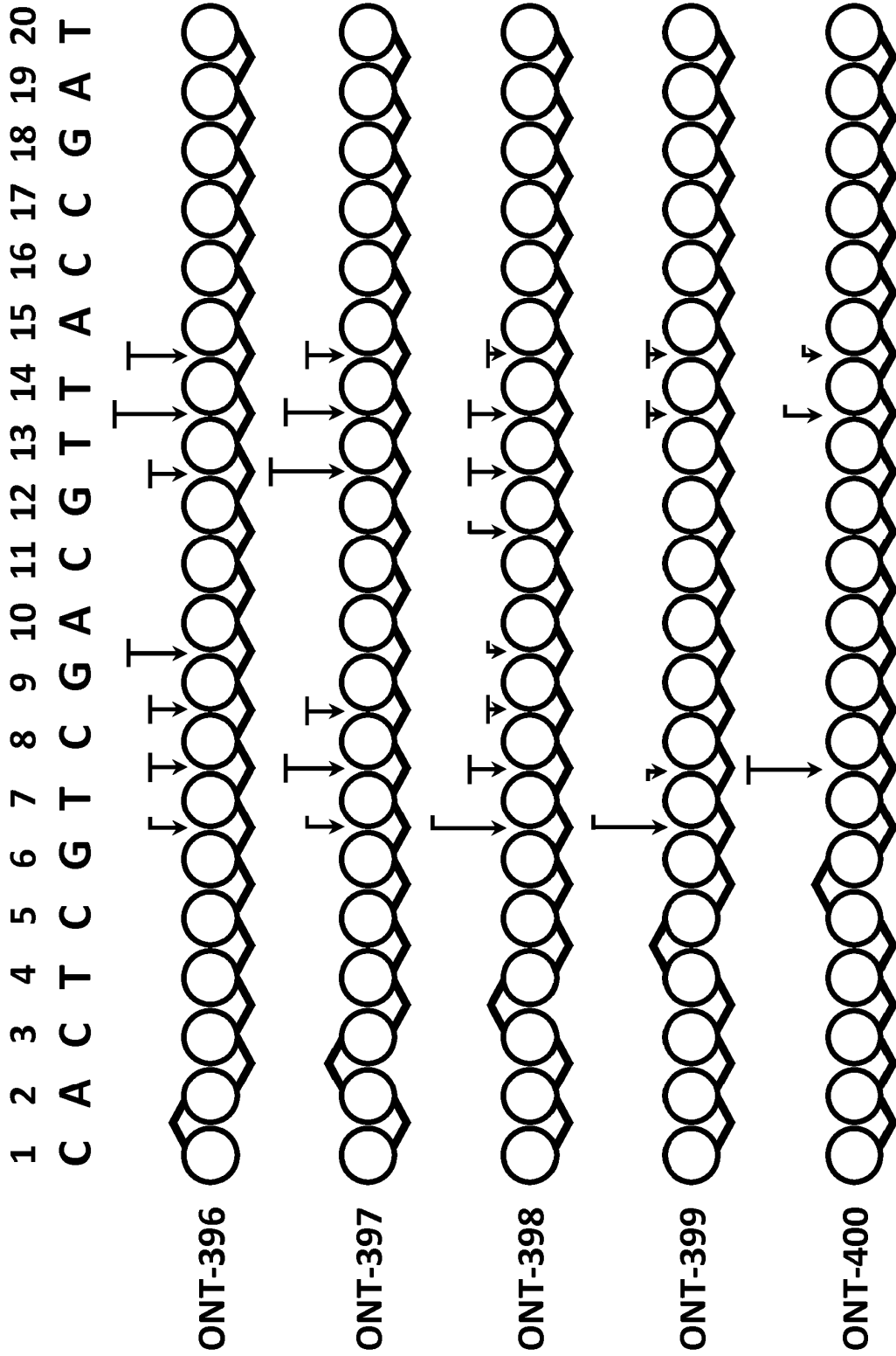
(PANEL A)

FIG. 25



(PANEL B)

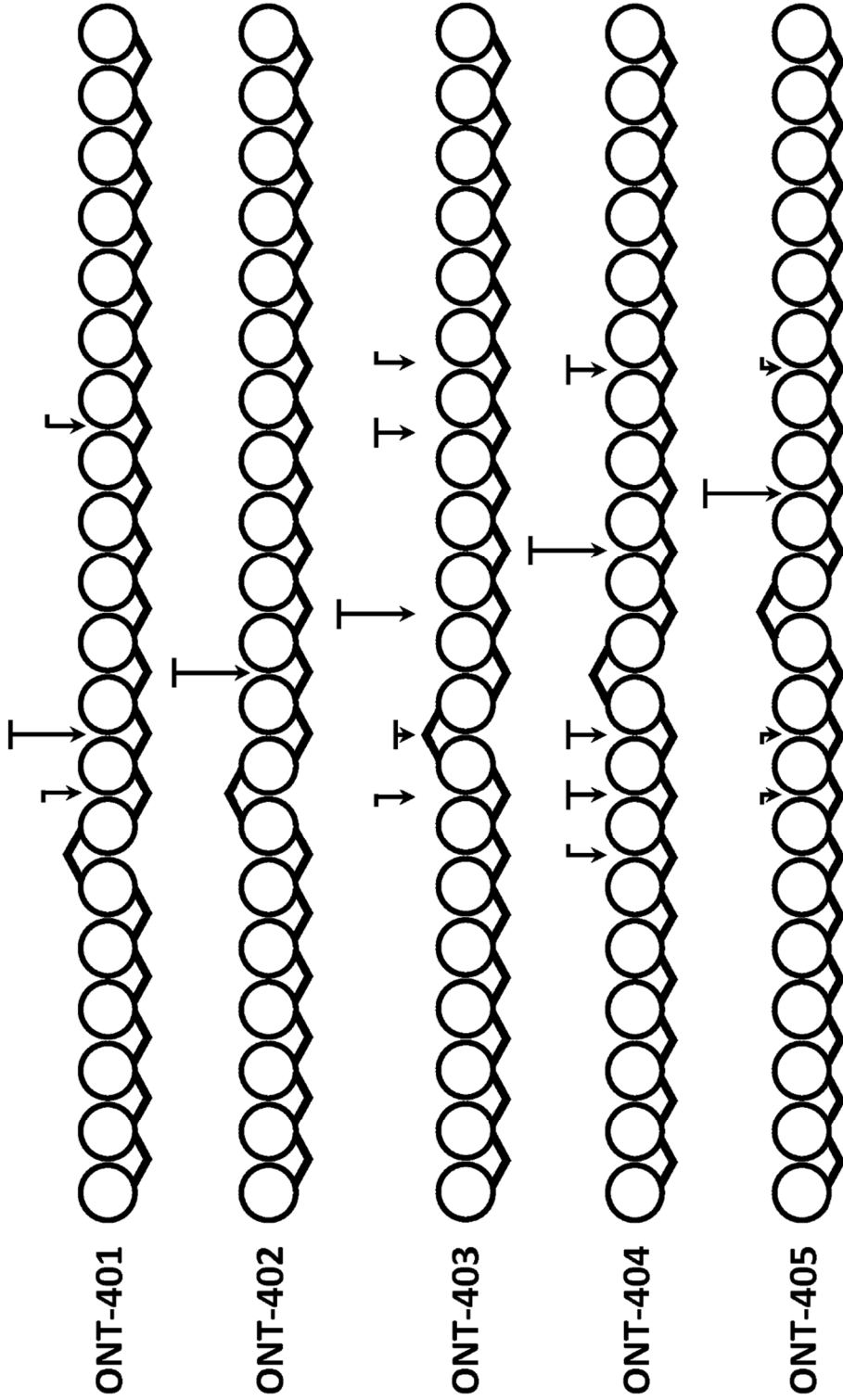
FIG. 25 (CONTINUACIÓN)



(PANEL A)

FIG. 26

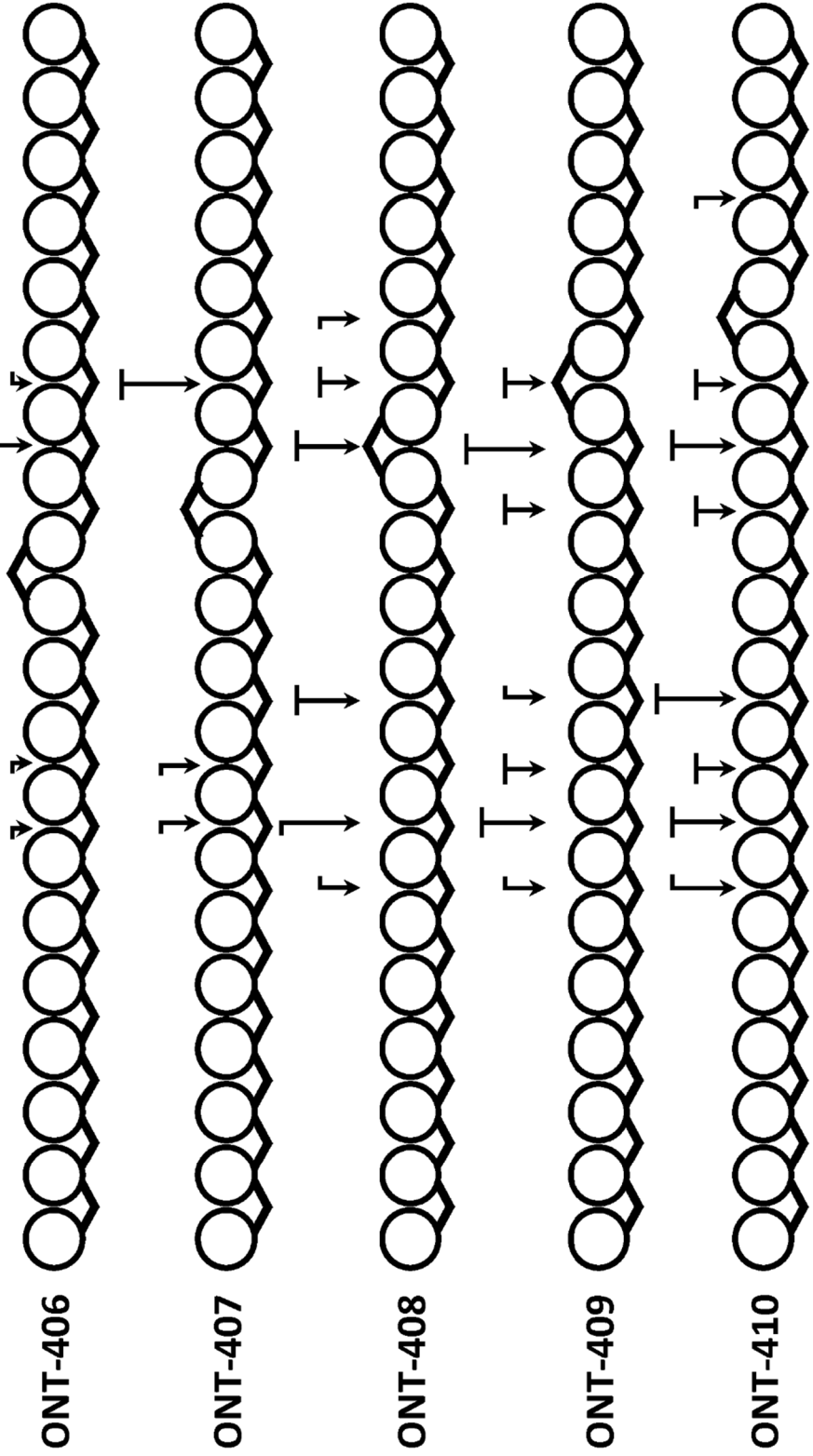
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T



(PANEL B)

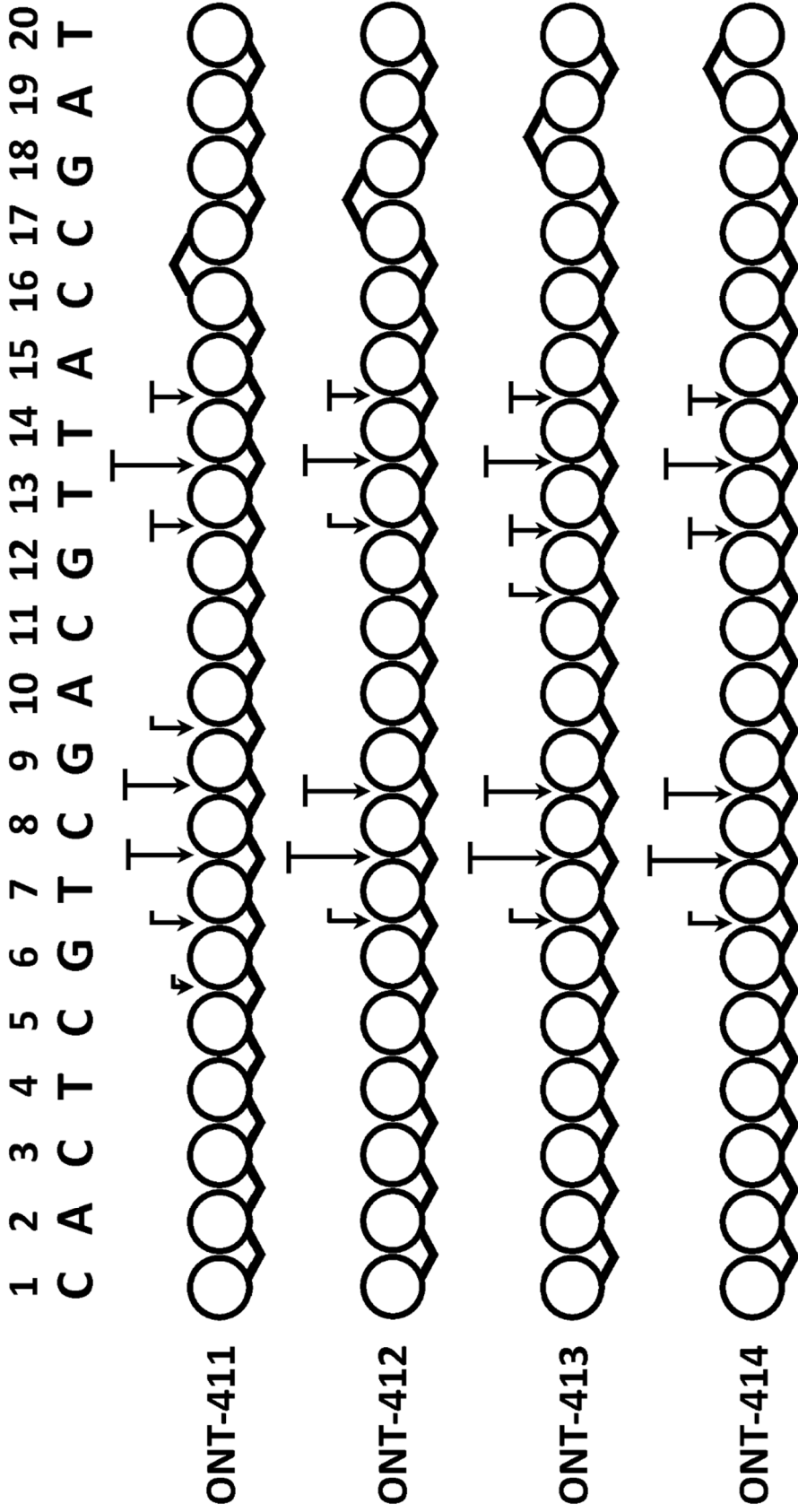
FIG. 26 (CONTINUACIÓN)

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
C A C T C G T C G A C G T T A C C G A T



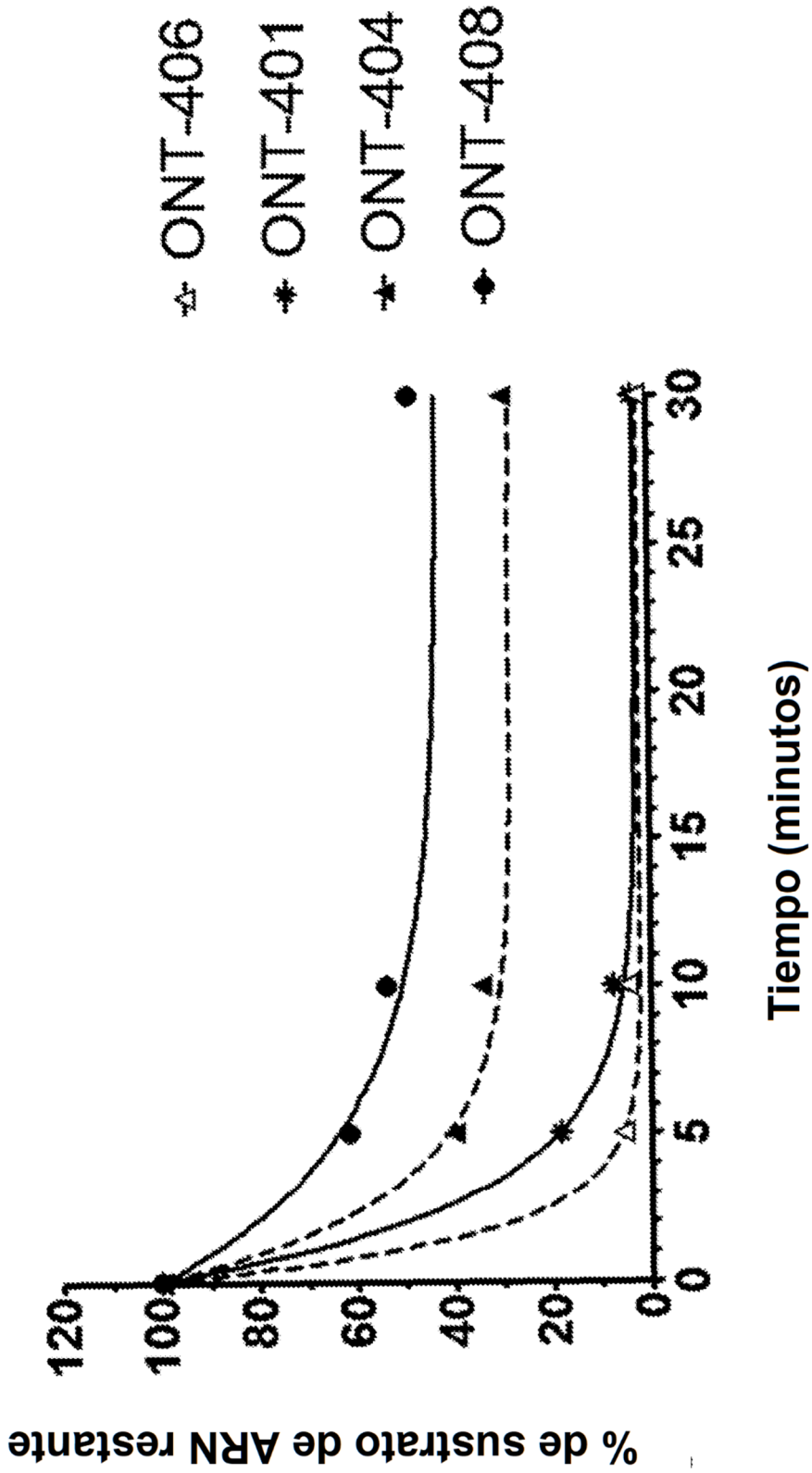
(PANEL C)

FIG. 26 (CONTINUACIÓN)



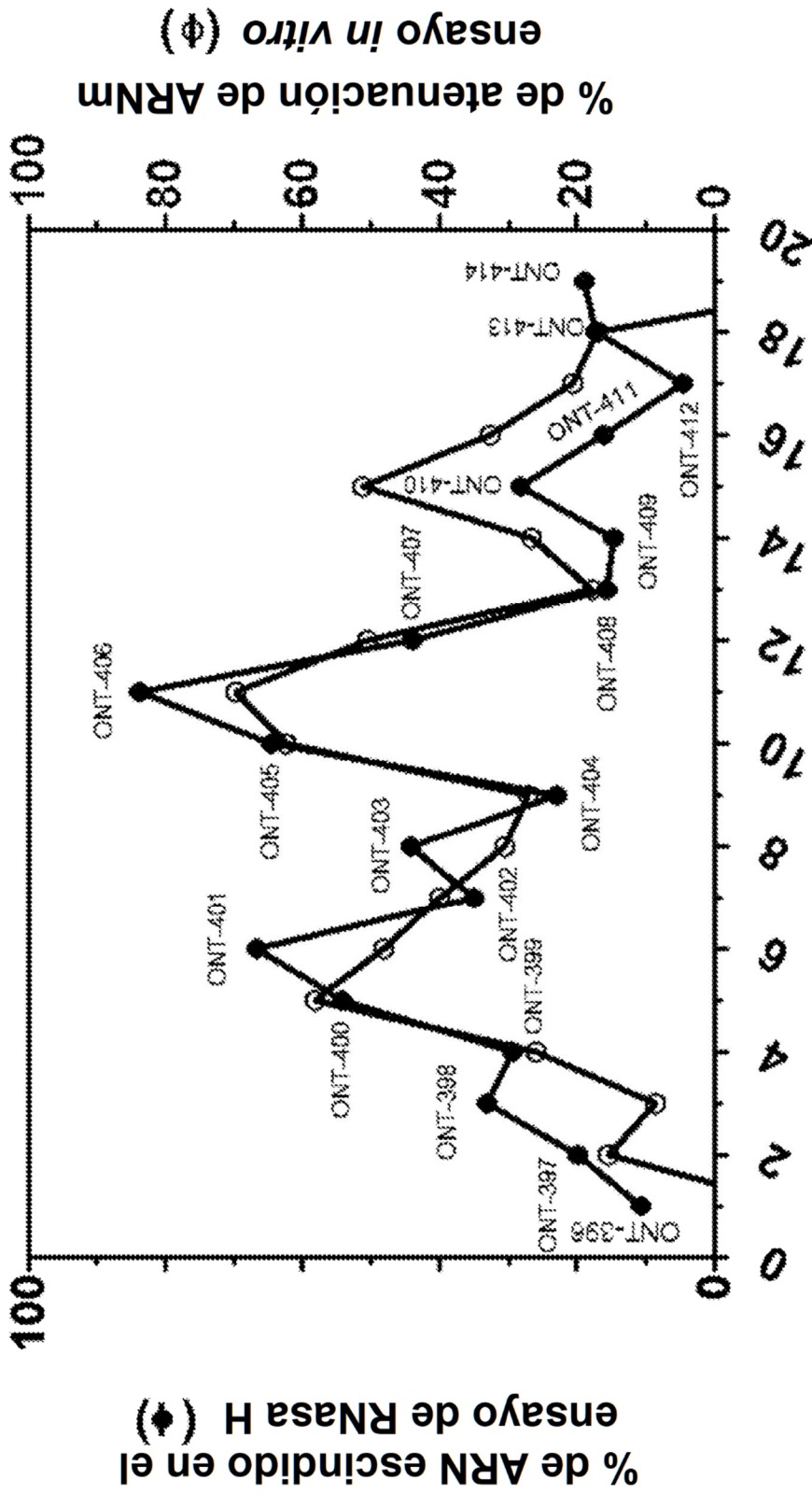
(PANEL D)

FIG. 26 (CONTINUACIÓN)



(PANEL A)

FIG. 27



Posición de Rp desde el extremo 3' de ADN

(PANEL B)

FIG. 27 (CONTINUACIÓN)



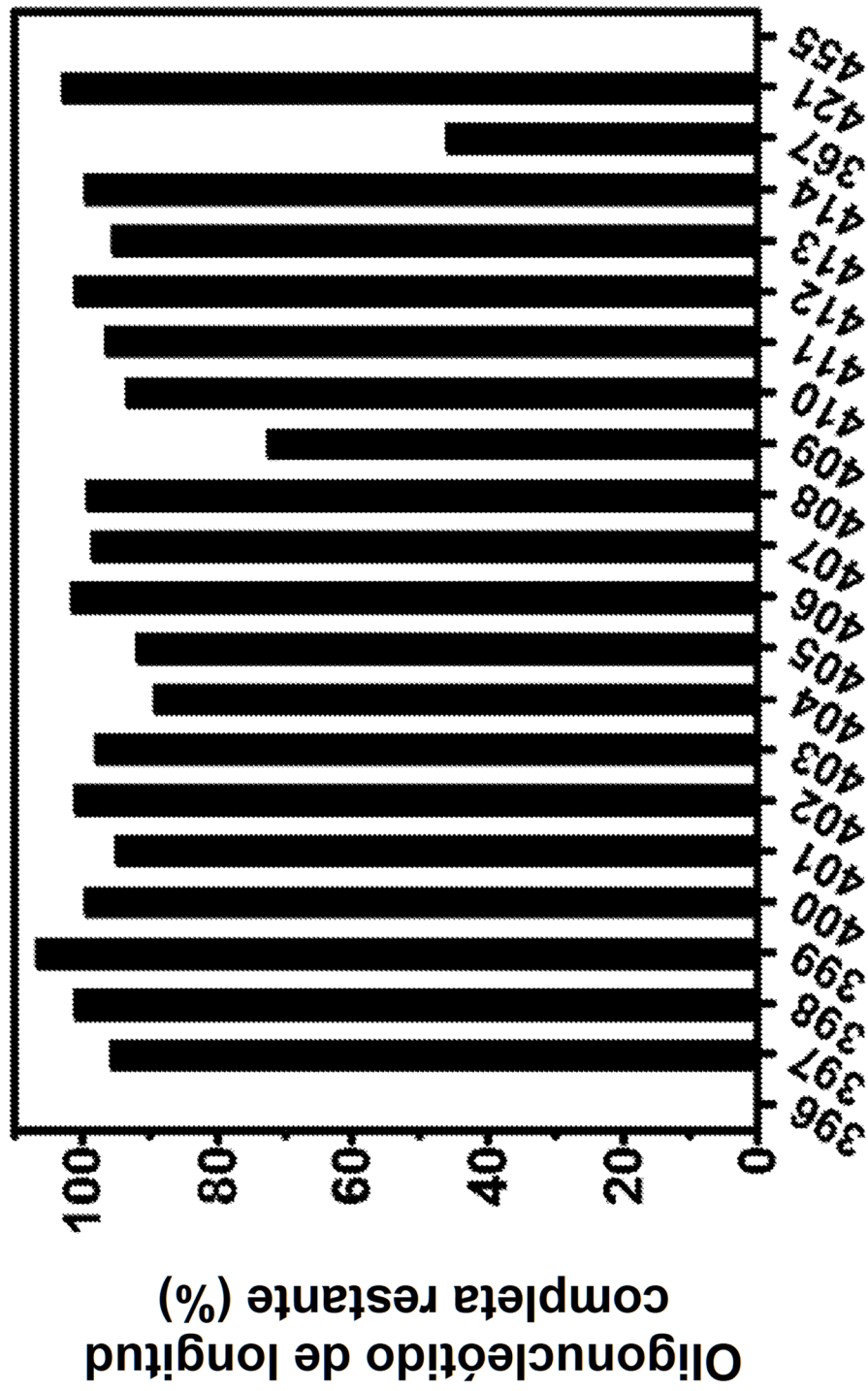
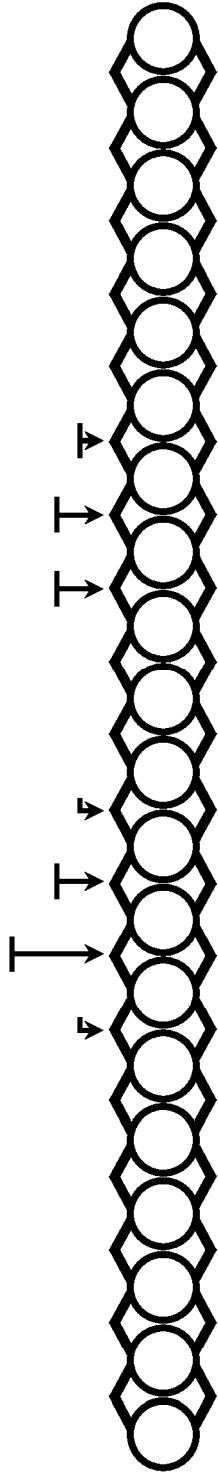
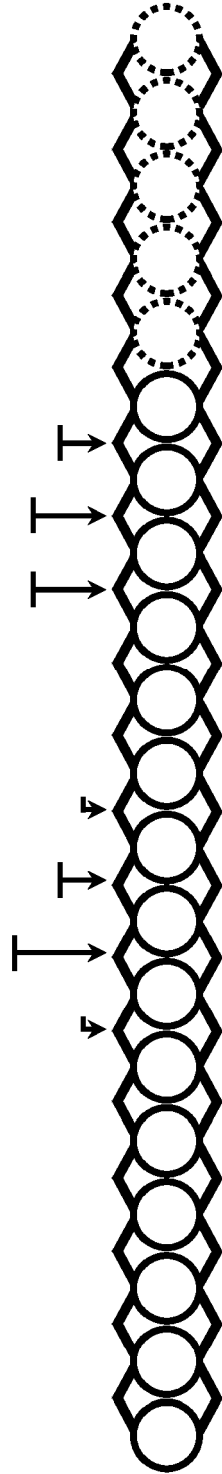


FIG. 28

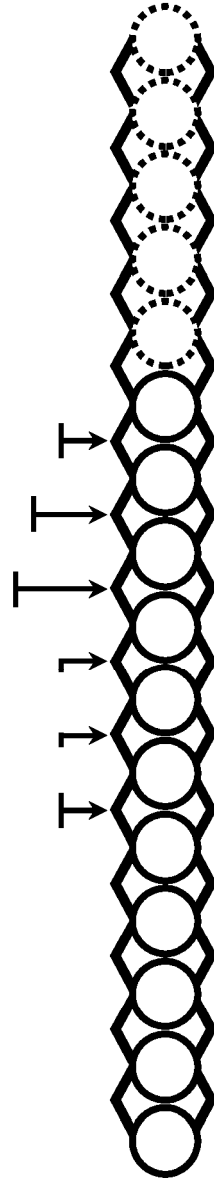
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20  
C A C T C G T C G A G G T T A C C G A T



ONT-367



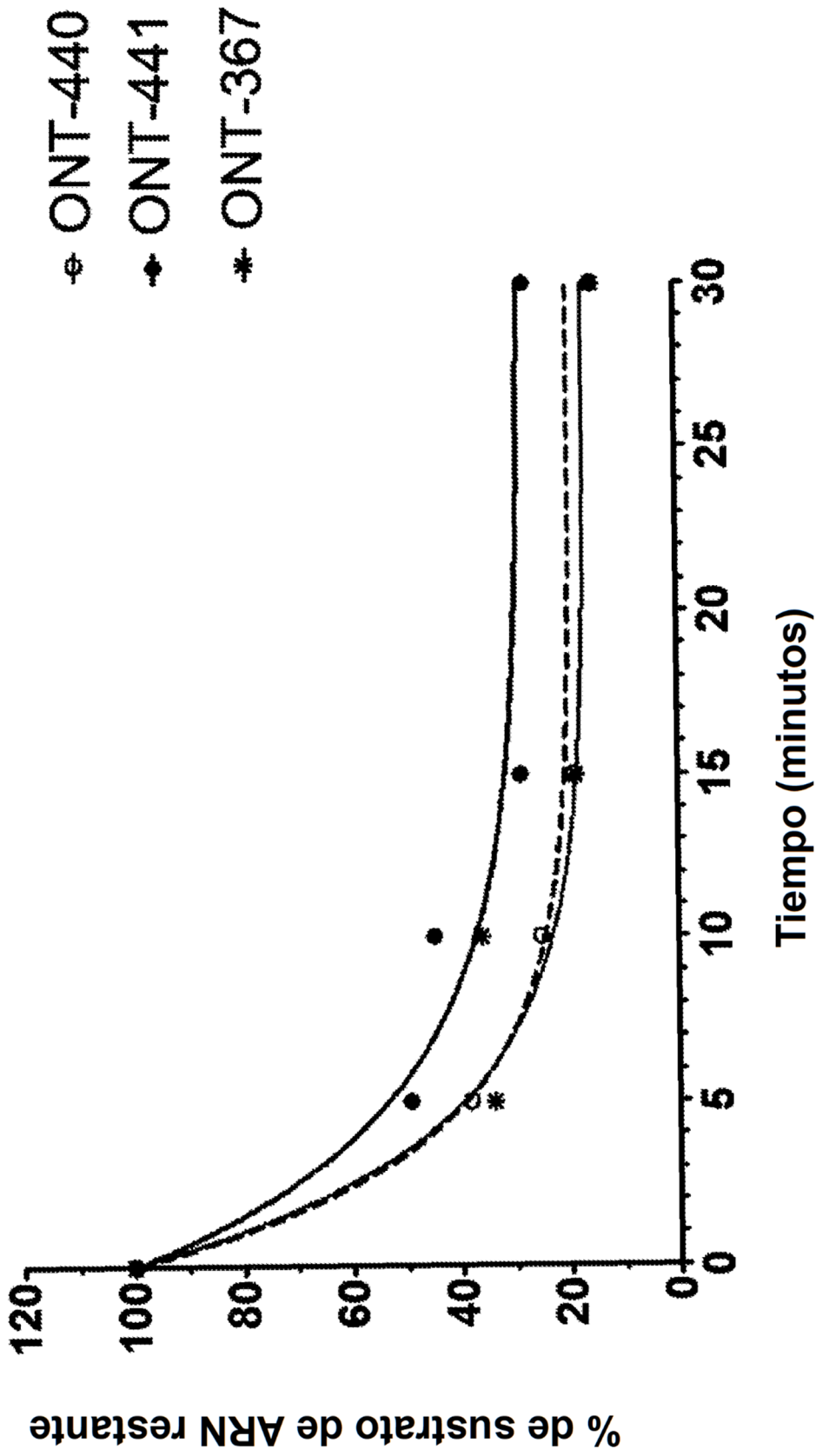
ONT-440



ONT-441

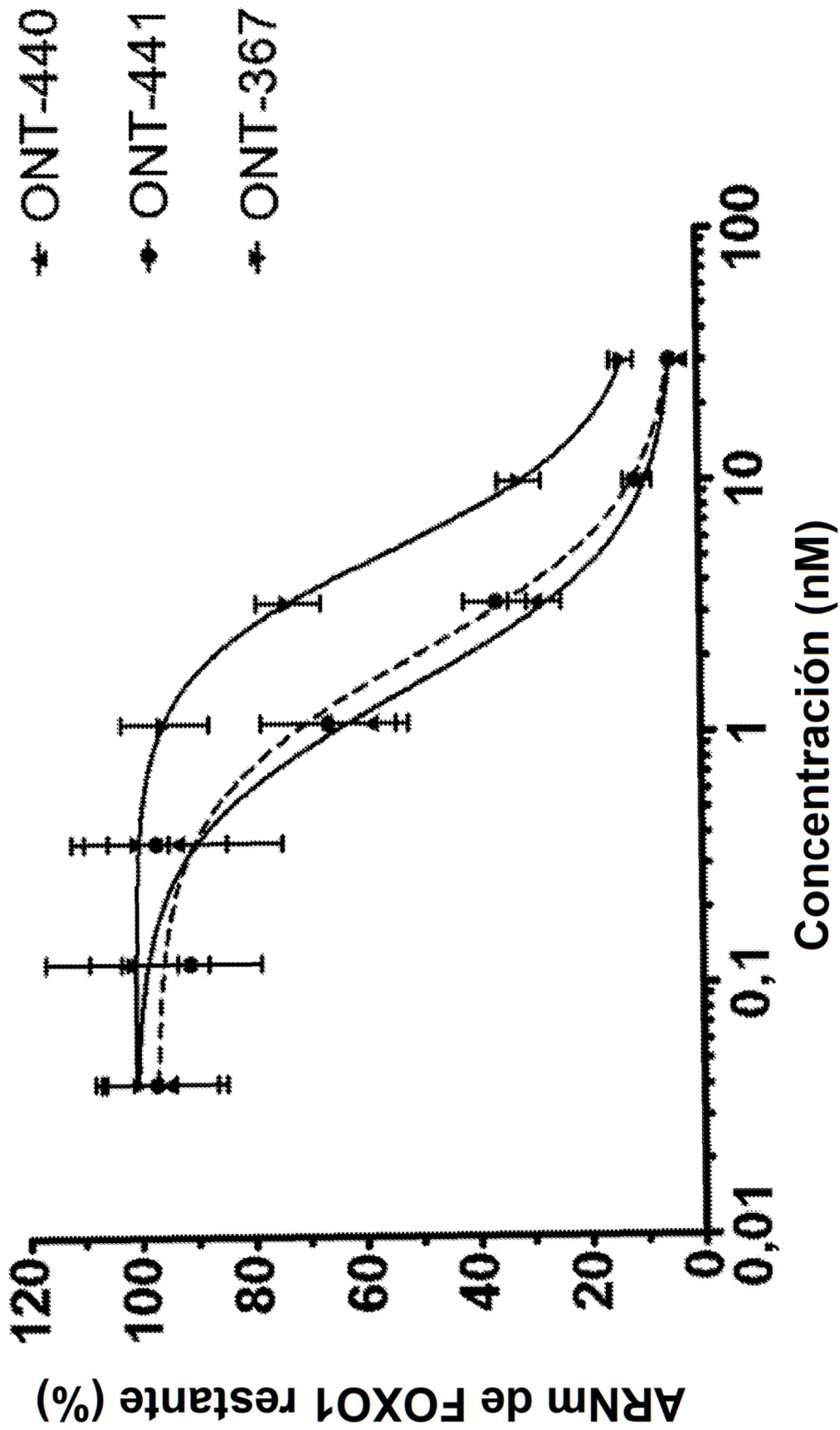
(PANEL A)

FIG. 29



(PANEL B)

FIG. 29 (CONTINUACIÓN)



(PANEL C)

FIG. 29 (CONTINUACIÓN)

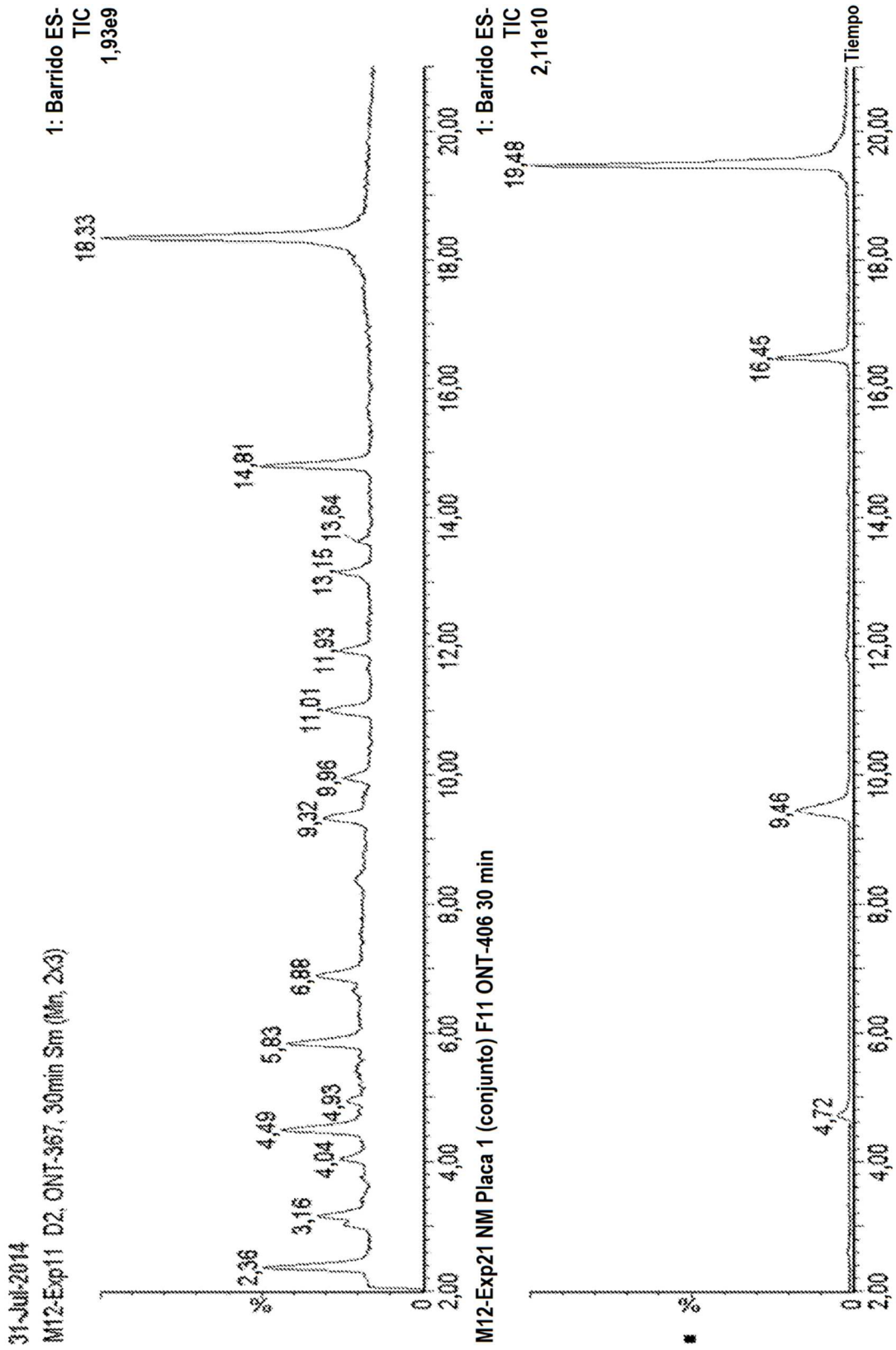


FIG. 30