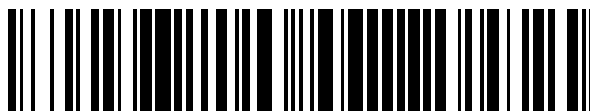


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 817**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**A61K 31/713** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.02.2011** **E 11703711 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.01.2016** **EP 2539451**

54 Título: **Composiciones para el suministro dirigido de ARNip**

30 Prioridad:

**24.02.2010 US 307490 P**

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

**08.03.2016**

73 Titular/es:

**ARROWHEAD RESEARCH CORPORATION  
(100.0%)  
225 South Lake Avenue, Suite 1050  
Pasadena, CA 91101, US**

72 Inventor/es:

**HADWIGER, PHILIPP;  
HOFFMANN, TORSTEN;  
KITAS, ERIC A.;  
LEWIS, DAVID L.;  
MOHR, PETER;  
ROZEMA, DAVID B.;  
THUER, WILMA;  
VALIS, LINDA CHRISTINE y  
WAKEFIELD, DARREN H.**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 562 817 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

Composiciones para el suministro dirigido de ARNip

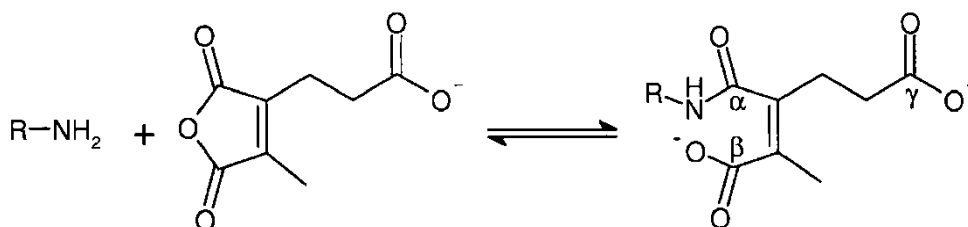
El suministro de polinucleótidos y otros compuestos sustancialmente impermeables a la membrana celular en una célula viva, está muy restringido por el complejo sistema de membrana de la célula. Los fármacos usados en terapias de sentido contrario, ARNi y génicas, son polímeros hidrófilos relativamente grandes y con frecuencia tienen carga negativa alta. Estas dos características físicas impiden su difusión directa a través de la membrana celular. Por esta razón, la principal barrera para el suministro de polinucleótidos es el suministro de polinucleótidos a través de una membrana celular al citoplasma o núcleo de la célula.

Un medio que se ha usado para suministrar ácido nucleico pequeño in vivo, ha sido unir el ácido nucleico a una molécula directora pequeña o un lípido o esteroide. Aunque se ha observado algo de suministro y actividad con estos conjugados, la dosis de ácido nucleico requerida con estos métodos ha sido prohibitivamente grande.

Se han desarrollado numerosos reactivos de transfección que consiguen el suministro razonablemente eficaz de polinucleótidos a las células in vitro. Sin embargo, el suministro de polinucleótidos in vivo usando estos mismos reactivos de transfección es complicado y se hace ineficaz por la toxicidad in vivo, interacciones con el suero, y poco direccionamiento. Los reactivos de transfección que funcionan bien in vitro, polímeros catiónicos y lípidos, típicamente forman partículas electrostáticas grandes y desestabilizan las membranas celulares. La carga positiva de los reactivos de transfección in vitro facilita la asociación con ácido nucleico mediante interacciones de carga-carga (electrostáticas) formando así el complejo de ácido nucleico/reactivo de transfección. La carga positiva también es beneficiosa para la unión no específica del vehículo a la célula y para la fusión, desestabilización o alteración de la membrana. La desestabilización de las membranas facilita el suministro de los polinucleótidos sustancialmente impermeables a la membrana celular, a través de una membrana celular. Aunque estas propiedades facilitan la transferencia del ácido nucleico in vitro, producen toxicidad y direccionamiento ineficaz in vivo. La carga catiónica produce interacción con componentes del suero, lo que produce desestabilización de la interacción del polinucleótido-reactivo de transfección y mala biodisponibilidad y direccionamiento. La actividad en la membrana de reactivos de transfección que pueden ser eficaces in vitro, a menudo conduce a toxicidad in vivo.

Para el suministro in vivo, el vehículo (ácido nucleico y agente de suministro asociado) debe ser pequeño, menor de 100 nm de diámetro, y preferiblemente menor de 50 nm. Incluso complejos más pequeños, menores de 20 nm o menores de 10 nm serían todavía más útiles. Los vehículos de suministro mayores de 100 nm tienen muy poco acceso a células que no sean células de los vasos sanguíneos, in vivo. Los complejos formados por interacciones electrostáticas tienden a agregarse o separarse cuando son expuestos a concentraciones salinas fisiológicas o componentes del suero. Además, la carga catiónica en vehículos de suministro in vivo conduce a interacciones adversas en el suero y por lo tanto a mala biodisponibilidad. Es interesante que la carga negativa alta también puede inhibir el suministro in vivo interfiriendo con las interacciones necesarias para el direccionamiento. Por lo tanto, se desean vehículos casi neutros para la distribución y direccionamiento in vivo. Sin una regulación cuidadosa, las actividades de alteración o desestabilización de la membrana son tóxicas cuando se usan in vivo. El equilibrio entre la toxicidad del vehículo y el suministro del ácido nucleico se logra más fácilmente in vitro que in vivo.

Rozema et al., en la publicación de patente de EE.UU. 20040162260, demostraron un medio para regular de forma reversible la actividad de alteración de la membrana de una poliamina activa en la membrana. La poliamina activa en la membrana proporcionaba un medio de alteración de las membranas celulares. La regulación reversible dependiente del pH proporcionaba un medio para limitar la actividad a los endosomas de las células diana, limitando así la toxicidad. Su método se basa en la modificación de aminas en una poliamina con anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico.



Esta modificación convertía el policatión en un polianión por conversión de aminas primarias en parejas de grupos carboxilo (carboxilo β y carboxilo γ) e inhibía de forma reversible la actividad en la membrana de la poliamina. Rozema et al. (*Bioconjugate Chem.* 2003, 14, 51-57) describieron que el carboxilo β no presentaba una carga negativa completa aparente y que por sí mismo no podía inhibir la actividad en la membrana. Se describió que la adición del grupo carboxilo γ era necesaria para la inhibición eficaz de la actividad en la membrana. Para permitir el cosuministro del ácido nucleico con el vehículo de suministro, el ácido nucleico se unió covalentemente al polímero de suministro. Pudieron mostrar el suministro de polinucleótidos a células in vitro, usando su sistema de suministro de conjugado biológicamente lábil. Sin embargo, debido a que el vehículo tenía carga negativa alta, teniendo tanto el ácido nucleico como el polímero modificado una densidad de carga negativa alta, este sistema no era eficaz para el

5 suministro in vivo. La carga negativa probablemente inhibía el direccionamiento específico de célula y potenciaba la absorción no específica por el sistema reticuloendotelial (RES). Usando también los polímeros modificados con el anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico, Rozema et al. demostraron la formación de complejos electrostáticos ternarios pequeños de ácidos nucleicos, policonjugados y polímeros modificados con anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico.

10 Rozema et al., en la publicación de patente de EE.UU. 20080152661, mejoró el método de la publicación de patente de EE.UU. 20040162260, eliminando la alta densidad de carga negativa del polímero activo en la membrana modificado. Sustituyendo el carboxilo y del anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico por grupos directores hidrófilos neutros (galactosa) y estabilizantes estéricos (PEG), Rozema et al. pudieron retener la solubilidad general en agua y la inhibición reversible de la actividad en la membrana, mientras que incorporaban direccionamiento eficaz in vivo a células hepatocitos. Como antes, el polinucleótido se unió covalentemente al polímero de transfección. La unión covalente del polinucleótido al polímero de transfección se mantuvo para asegurar el cosuministro del polinucleótido con el polímero de transfección a la célula diana durante la administración in vivo, previniendo la disociación del polinucleótido del polímero de transfección. El cosuministro del polinucleótido y el polímero de transfección era necesario debido a que polímero de transfección proporcionaba transporte del polinucleótido a través de la membrana celular, desde fuera de la célula o desde dentro de un compartimiento endocítico, al citoplasma de la célula. La publicación de patente de EE.UU. 20080152661 demostraba suministro muy eficaz de polinucleótidos, específicamente oligonucleótidos ARNi, a células hepáticas in vivo, usando este nuevo policonjugado fisiológicamente sensible mejorado. El documento US 2008281041 describe la inactivación reversible de los polímeros activos en la membrana, útil para el suministro celular de compuestos. Se describen sistemas de policonjugados que incorporan actividades de dirección, antiopsonización, antiagregación y transfección en conjugados de suministro in vivo biocompatibles pequeños, en donde el uso de múltiples uniones reversibles que conectan partes componentes proporciona la modulación de la actividad fisiológicamente sensible.

25 Sin embargo, la unión covalente del ácido nucleico a la poliamina conlleva limitaciones inherentes. La modificación de los polímeros de transfección, para unir tanto el ácido nucleico como los agentes de enmascaramiento, es complicada por las interacciones de cargas. La unión de un ácido nucleico con carga negativa a un polímero con carga positiva tiene tendencia a la agregación, limitando de esta forma la concentración de la mezcla. La agregación se puede superar por la presencia de un exceso del policonjugado o polianión. Sin embargo, esta solución limita las proporciones en las que se pueden formular el ácido nucleico y el polímero. Además, la unión del ácido nucleico con carga negativa al polímero catiónico sin modificar, produce condensación y agregación del complejo e inhibe la modificación del polímero. La modificación del polímero, formando un polímero negativo, impide la unión del ácido nucleico.

35 En una realización preferida, la invención se caracteriza por una composición para suministrar un polinucleótido de ARN interferente a una célula hepática in vivo, que comprende: una poliamina activa en la membrana reversiblemente enmascarada dirigida al receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) (polímero de suministro) y un polinucleótido de ARN interferente conjugado con un grupo hidrófobo que contiene al menos 20 átomos de carbono (conjugado de ARN). El polímero de suministro y el conjugado de ARN se sintetizan por separado y se pueden suministrar en recipientes separados o en un solo recipiente. El polinucleótido de ARN interferente no está conjugado con el polímero.

40 En una realización preferida, la invención se caracteriza por una composición para suministrar un polinucleótido de ARN interferente a una célula hepática in vivo, que comprende: una poliamina activa en la membrana reversiblemente enmascarada dirigida al ASGPr (polímero de suministro) y un polinucleótido de ARN interferente conjugado con una galactosamina trivalente (conjugado de ARN). El polímero de suministro y el conjugado de ARN se sintetizan por separado y se pueden suministrar en recipientes separados o en un solo recipiente. El polinucleótido de ARN interferente no está conjugado al polímero.

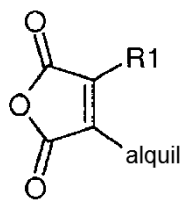
50 En una realización, la poliamina activa en la membrana comprende: un polímero anfipático formado por polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina y monómeros que contienen grupos hidrófobos inferiores. Los monómeros que contienen amina contienen grupos amina colgantes seleccionados del grupo que consiste en: amina primaria y amina secundaria. Los monómeros hidrófobos inferiores contienen grupos hidrófobos colgantes que tienen 1-6 átomos de carbono. La relación de grupos amina a grupos hidrófobos se selecciona para formar un polímero soluble en agua con actividad de alteración de la membrana, preferiblemente  $\geq 1$  monómero de amina por monómero hidrófobo. En una realización, el polímero tendrá 60-80% de monómeros de amina. Los grupos hidrófobos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: grupo alquilo, grupo alqueno, grupo alquino, grupo arilo, grupo aralquilo, grupo aralqueno y grupo aralquino, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. Los grupos hidrófobos son preferiblemente hidrocarburos, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, pueden estar permitidas sustituciones o heteroátomos que mantengan la hidrofobicidad, e incluyen, por ejemplo flúor. Las poliaminas activas en membrana particularmente adecuadas comprenden copolímeros aleatorios de poli(éter vinílico) o copolímeros aleatorios de poliacrilato.

60 En una realización, la poliamina activa en la membrana comprende: un polímero anfipático formado por polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina, monómeros hidrófobos inferiores y monómeros hidrófobos superiores. Los monómeros que contienen amina contienen grupos amina colgantes seleccionados del

grupo que consiste en: amina primaria y amina secundaria. Los monómeros hidrófobos inferiores contienen grupos hidrófobos colgantes que tienen 1-6 átomos de carbono. Los monómeros hidrófobos superiores contienen grupos hidrófobos colgantes que tienen 12-36 o más átomos de carbono. La relación de grupos amina a grupos hidrófobos se selecciona para formar un polímero soluble en agua con actividad de alteración de la membrana, preferiblemente  $\geq 1$  monómero de amina por monómero hidrófobo. En una realización, el polímero tendrá 60-80% de monómeros de amina. Los grupos hidrófobos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: grupo alquilo, grupo alquenilo, grupo alquinilo, grupo arilo, grupo aralquilo, grupo aralquenilo y grupo aralquinilo, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico, esteroide, esteroide o derivado de esteroide. Los grupos hidrófobos son preferiblemente hidrocarburos, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, pueden estar permitidas sustituciones o heteroátomos que mantengan la hidrofobicidad, e incluyen, por ejemplo flúor. Las poliaminas activas en membrana particularmente adecuadas comprenden terpolímeros aleatorios de poli(éter vinílico) o terpolímeros aleatorios de poli(acrilato). En una realización preferida, una poliamina activa en la membrana reversiblemente enmascarada comprende una poliamina activa en la membrana de la invención reversiblemente modificada por reacción de aminas en el polímero con agentes de enmascaramiento.

En una realización preferida, una poliamina activa en la membrana enmascarada reversiblemente comprende una poliamina de la invención activa en la membrana modificada reversiblemente por reacción de aminas en el polímero con agentes enmascarantes. Una amina se modifica reversiblemente si la escisión del grupo modificador restablece la amina. La modificación reversible de la poliamina activa en la membrana inhibe reversiblemente la actividad en la membrana de la poliamina activa en la membrana. Preferiblemente, un agente de enmascaramiento también proporciona función directora y/o función para evitar la interacción en el suero. La modificación de la amina del polímero con un agente de enmascaramiento preferiblemente también neutraliza la carga de la amina. Un agente de enmascaramiento preferido comprende una galactosamina o derivado de galactosamina o un polietilenglicol que tiene un grupo anhídrido maleico disustituido reactivo con amina. La reacción del anhídrido con una amina modifica reversiblemente la amina para formar un maleamato o ácido maleámico. En el estado enmascarado, la poliamina activa en la membrana reversiblemente enmascarada no presenta actividad de alteración de la membrana. Puede ser necesaria la modificación reversible de más de 50%, más de 55%, más de 60%, más de 65%, más de 70%, más de 75%, o más de 80%, de las aminas en la poliamina con agentes de enmascaramiento para inhibir la actividad en la membrana y proporcionar una función de direccionamiento a la célula, es decir, formar un polímero activo en la membrana reversiblemente enmascarado. La inhibición de la actividad en la membrana y/o el direccionamiento in vivo de las poliaminas activas en la membrana descritas, requiere la modificación de  $>50\%$  de las aminas del polímero.

Un agente de enmascaramiento descrito comprende un anhídrido alquilmaleico sustituido hidrófilo neutro:



en donde R1 comprende un resto director o un estabilizante estérico. Un ejemplo de un anhídrido alquilmaleico sustituido consiste en un derivado del anhídrido 2-propiónico-3-alquilmaleico. Un derivado de anhídrido 2-propiónico-3-alquilmaleico hidrófilo neutro se forma por unión de un grupo hidrófilo neutro a un anhídrido 2-propiónico-3-alquilmaleico a través del grupo carboxilo y del anhídrido 2-propiónico-3-alquilmaleico. En una realización, el grupo alquilo consiste en un grupo metilo.

Un agente de enmascaramiento preferido proporciona función directora a través de la afinidad por receptores de la superficie celular, es decir, el agente de enmascaramiento contiene un ligando para un receptor de superficie celular. Los agentes de enmascaramiento preferidos contienen sacáridos que tienen afinidad por el ASGPr, incluyendo, pero no limitado a: galactosa, N-Acetil-galactosamina y derivados de galactosa. Los derivados de galactosa que tienen afinidad por el ASGPr son bien conocidos en la técnica. Una característica esencial de la poliamina activa en la membrana reversiblemente enmascarada es que al menos algunos, y tantos como todos, los agentes de enmascaramiento unidos a un polímero, proporcionan función de direccionamiento a la célula. Otro agente de enmascaramiento preferido proporciona biodistribución mejorada por la inhibición de interacciones no específicas entre el polímero reversiblemente modificado y los componentes del suero o células no diana, y reduciendo la agregación del polímero. Los agentes de enmascaramiento preferidos que tienen función estabilizante estérica incluyen, pero no se limitan a polietilenglicoles. En una realización, se usa una combinación de agentes de enmascaramiento directores y estabilizantes estéricos.

El conjugado de polinucleótido de ARNi y el polímero de suministro se administran a un mamífero en vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En una realización, el polímero de suministro y el conjugado de polinucleótido de ARNi se pueden combinar en una disolución antes de la administración al mamífero. En otra realización, el polímero de suministro y el conjugado de polinucleótido de ARNi se pueden coadministrar al mamífero

en disoluciones separadas. En otra realización más, el polímero de suministro y el conjugado de polinucleótido de ARNi se pueden administrar al mamífero de forma secuencial. Para la administración secuencial, el polímero de suministro se puede administrar antes del conjugado de polinucleótido de ARNi. Alternativamente, para la administración secuencial el conjugado de polinucleótido de ARNi se puede administrar antes de la administración del polímero de suministro.

Otros objetos, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada cuando se considere junto con los dibujos adjuntos.

FIG. 1. Esquema de reacción para la polimerización de terpolímeros aleatorios de poli(éter vinílico) anfipáticos.

FIG. 2. Gráfica que ilustra el efecto de la dosis de conjugado de ARNi-colesterol en la inactivación génica.

FIG. 3. Gráfica que ilustra el efecto del tamaño del grupo hidrófobo en el conjugado de ARNi-grupo hidrófobo en el direccionamiento al hígado.

FIG. 4. Gráfica que ilustra el efecto de la dosis del conjugado de ARNi-grupo hidrófobo en la inactivación génica, para varios grupos hidrófobos.

FIG. 5. Gráfica que ilustra el efecto de la dosis de polímero de suministro en el suministro del conjugado de ARNi-grupo hidrófobo en el hígado.

FIG. 6. Unión de agrupación de GalNAc al ARNi

Se describe en la presente memoria un método mejorado para suministrar polinucleótidos de ARNi interferente (ARNi), a células hepáticas en un mamífero, in vivo. El método también proporciona métodos mejorados de producción de vehículos de suministro de polinucleótidos de ARNi. Anteriormente, el suministro in vivo de polinucleótidos requería la asociación física del polinucleótido con el vehículo de suministro. El polinucleótido se asociaba electrostáticamente con un vehículo de suministro, como en complejos de polinucleótido/ácido nucleico, se encapsulaba con el vehículo de suministro, como en liposomas y partículas de ácido nucleico-lípido estables (SNALP), o se unían covalentemente a un vehículo de suministro, como en Dynamic PolyConjugates (Rozema et al. 2007). Sorprendentemente, los autores de la invención han encontrado que usando moléculas de conjugado de polinucleótido de ARNi adecuadas y polímeros de suministro adecuadamente dirigidos, el polinucleótido de ARNi se puede separar del polímero de suministro y conseguir todavía suministro eficaz del polinucleótido a los hepatocitos.

La capacidad para separar el polinucleótido del polímero de suministro proporciona ventajas en la formulación, síntesis y fabricación.

a) Al eliminar el requisito de que el polinucleótido y el polímero estén asociados, sea por unión covalente o por interacción de carga-carga, la concentración de los polímeros y polinucleótidos y la relación entre ellos, está limitada solo por la solubilidad de los componentes en lugar de por la solubilidad del complejo asociado o la capacidad de fabricación del complejo. Una mayor solubilidad permite mayor concentración de polinucleótido o polímero de suministro y por lo tanto mayor dosis de administración.

b) El polinucleótido y el polímero de suministro se pueden mezclar en cualquier momento antes de la administración, o incluso administrar por separado. Por lo tanto, la separación permite que los componentes se almacenen por separado, sea en disolución o en seco.

c) Es posible una formulación más pequeña, más estable, comparado con los sistemas de suministro no covalentes, inherentemente inestables, más grandes.

d) La fabricación del polímero de suministro enmascarado es más fácil en ausencia de un polinucleótido con carga negativa unido covalentemente o de la necesidad de unir covalentemente un polinucleótido con carga negativa.

e) La fabricación se simplifica y requiere menos etapas en ausencia de la asociación física del polinucleótido con el polímero de suministro.

f) Se observan mejoras en el direccionamiento del ARNi y el polímero.

La invención incluye sistemas de suministro de conjugado de estructura general:



en donde **N** es un polinucleótido de ARNi, **T** es un resto que dirige al polinucleótido (sea un grupo hidrófobo que tiene 20 o más átomos de carbono o una agrupación de galactosas), **P** es una poliamina activa en la membrana, y el agente de enmascaramiento **M<sup>1</sup>** contiene un resto director, una galactosa o derivado de galactosa que tiene afinidad por el receptor de la asialoglicoproteína, covalentemente unido a **P** por un enlace reversible en condiciones fisiológicas **L**, tal como un enlace maleamato. La escisión de **L** restablece la amina sin modificar en la poliamina **P**. El agente de enmascaramiento **M<sup>2</sup>** es opcional. Si está presente, **M<sup>2</sup>** es un estabilizante estérico hidrófilo unido

covalentemente a **P** por un enlace reversible en condiciones fisiológicas **L**, tal como un enlace maleamato. **x** y **y** son números enteros. En su estado sin modificar, **P** es una poliamina activa en la membrana. El polímero de suministro  $(M^1-L)_x-P-(L-M^2)_y$  no es activo en la membrana. La modificación reversible de las aminas **P**, por unión de **M**<sup>1</sup> y opcionalmente **M**<sup>2</sup>, inhibe o inactiva de forma reversible la actividad en la membrana de **P** y reduce la carga positiva neta de **P**. Se unen suficientes agentes de enmascaramiento a **P** para inhibir la actividad en la membrana del polímero. **x + y** tiene un valor mayor que 50%, más preferiblemente mayor que 60%, y más preferiblemente mayor que 70% de las aminas en la poliamina **P**, determinado por la cantidad de aminas en **P** en ausencia de cualquier agente de enmascaramiento. Tras la escisión de las uniones reversibles **L**, se restablecen las aminas sin modificar volviendo de esta manera **P** a su estado sin modificar, activo en la membrana. El enlace reversible de la unión reversible **L** se elige de forma que la escisión se produce en unas condiciones fisiológicas deseadas, tal como presente en un tejido, órgano o situación subcelular deseada. Una unión reversible preferida en una unión lábil al pH.  $(M^1-L)_x-P-(L-M^2)_y$ , un polímero activo en la membrana reversiblemente enmascarado dirigido al ASGPr (polímero enmascarado), y **T-N**, un conjugado de polinucleótido, se sintetizan o fabrican por separado. Ni **T** ni **N** están unidos covalentemente, directa o indirectamente, a **P**, **L**, **M**<sup>1</sup> o **M**<sup>2</sup>. No es necesaria la asociación electrostática o hidrófoba del polinucleótido o conjugado de polinucleótido con el polímero enmascarado o no enmascarado, para el suministro hepático in vivo del polinucleótido. El polímero enmascarado y el conjugado de polinucleótido se pueden suministrar en el mismo recipiente o en recipientes separados. Se pueden combinar antes de la administración, coadministrar o administrar secuencialmente.

#### Polímero

Los polímeros de la invención son poliaminas activas en la membrana anfipáticas. Un polímero es una molécula construida por la unión repetitiva de unidades más pequeñas llamadas monómeros. Un polímero puede ser un homopolímero en el que se usa un solo monómero, o un polímero puede ser un copolímero o heteropolímero en el que se usan dos o más monómeros diferentes. La cadena principal de un polímero está compuesta de átomos cuyos enlaces son necesarios para la propagación de la longitud del polímero. Una cadena lateral de un polímero está compuesta de átomos cuyos enlaces no son necesarios para la propagación de la longitud del polímero.

Más específicamente, los polímeros de la invención son copolímeros aleatorios anfipáticos activos en la membrana. Los monómeros en los copolímeros aleatorios no tienen una disposición definida a lo largo de la cadena principal, y se escriben, por ejemplo, como:  $-A_x-B_y-$  o  $-A_x-B_y-C_z-$ . Las composiciones generales de dichos polímeros son reflejo de la relación de monómeros que entran. Sin embargo, la relación exacta de un monómero respecto a otro puede diferir entre cadenas. La distribución de los monómeros también puede diferir a lo largo de la longitud de un solo polímero. Además, las propiedades químicas de un monómero pueden afectar a su velocidad de incorporación en un copolímero aleatorio y su distribución dentro del polímero. Aunque la relación de monómeros en un polímero aleatorio depende de la relación de entrada del monómero, la relación de entrada puede no corresponderse exactamente con la relación de los monómeros incorporados.

#### Anfipático

Los polímeros anfipáticos, o anfífilos, son bien conocidos y reconocidos en la técnica y tienen tanto grupos hidrófilos (polares, solubles en agua) como hidrófobos (no polares, lipófilos, insolubles en agua).

Los grupos hidrófilos indican en términos cualitativos que el resto químico prefiere el agua. Típicamente, dichos grupos químicos son solubles en agua, y son donadores de enlaces de hidrógeno o aceptores con el agua. Un grupo hidrófilo puede tener carga o no tener carga. Los grupos con carga pueden tener carga positiva (aniónico) o carga negativa (catiónico) o ambas (de ion híbrido). Los ejemplos de grupos hidrófilos incluyen los siguientes restos químicos: hidratos de carbono, polioxietileno, algunos péptidos, oligonucleótidos, aminas, amidas, alcóxiamidas, ácidos carboxílicos, sulfuros e hidroxilos.

Los grupos hidrófobos indican en términos cualitativos que el resto químico evita el agua. Típicamente, dichos grupos químicos no son solubles en agua, y no tienden a formar enlaces de hidrógeno. Los grupos lipófilos se disuelven en grasas, aceites, lípidos y disolventes no polares y tienen poca o no tienen capacidad para formar enlaces de hidrógeno. Los hidrocarburos que contienen dos (2) o más átomos de carbono, algunos hidrocarburos sustituidos, colesterol y derivados de colesterol son ejemplos de grupos y compuestos hidrófobos.

Como se usa en la presente memoria, con respecto a los polímeros anfipáticos, una parte se define como una molécula obtenida cuando un enlace covalente se rompe y se sustituye por hidrógeno. Por ejemplo, en la butilamina, la rotura entre los enlaces de carbono y nitrógeno y sustitución por hidrógenos, da como resultado amoniaco (hidrófilo) y butano (hidrófobo). Si el 1,4-diaminobutano se escinde por los enlaces nitrógeno-carbono, y se sustituyen por hidrógenos, las moléculas resultantes son de nuevo amoniaco (2x) y butano. Sin embargo, el 1,4-diaminobutano no se considera anfipático porque la formación de la parte hidrófoba requiere la rotura de dos enlaces.

Como se usa en la presente memoria, un polímero tensioactivo disminuye la tensión superficial del agua y/o la tensión interfacial con otras fases, y por consiguiente es adsorbido positivamente en la interfase de líquido/vapor. La

propiedad de tensioactividad normalmente se debe al hecho de que las moléculas de la sustancia son anfipáticas o anfífilas.

#### Activo en la membrana

5 Como se usa en la presente memoria, los polímeros activos en la membrana son polímeros anfipáticos tensioactivos, que son capaces de inducir uno o más de los siguientes efectos sobre una membrana biológica: una alteración o perturbación de la membrana que permite que moléculas no permeables a la membrana entren en una célula o crucen la membrana, formación de poro en la membrana, rotura de membranas, o alteración o disolución de la membrana. Como se usa en la presente memoria, una membrana o membrana celular, comprende una bicapa lipídica. La alteración o perturbación de la membrana se puede definir funcionalmente por la actividad del polímero en al menos uno de los siguientes ensayos: lisis de glóbulos rojos (hemólisis), fuga del liposoma, fusión de liposomas, fusión celular, lisis celular y liberación endosómica. Los polímeros activos en la membrana que pueden producir la lisis de membranas celulares también se denominan polímeros líticos de membranas. Los polímeros que producen con preferencia alteración de endosomas o lisosomas frente a la membrana plasmática se consideran endosomolíticos. El efecto de los polímeros activos en la membrana sobre una membrana celular puede ser transitorio. Los polímeros activos en la membrana tienen afinidad por la membrana y producen una desnaturalización o deformación de las estructuras de bicapa. Los polímeros activos en la membrana pueden ser sintéticos o polímeros anfipáticos no naturales.

20 Como se usa en la presente memoria, los polímeros activos en la membrana son distintos de una clase de polímeros denominados péptidos o polímeros que penetran en las células representados por compuestos tales como péptido rico en arginina derivado de la proteína TAT del VIH, el péptido antennapedia, péptido VP22, transportano, péptidos artificiales ricos en arginina, polímeros artificiales ricos en guanidinio pequeños, y similares. Aunque los compuestos que penetran en las células parece que transportan algunas moléculas a través de una membrana, de un lado de la bicapa lipídica al otro lado de la bicapa lipídica, aparentemente sin requerir endocitosis y sin alterar la integridad de la membrana, su mecanismo no se entiende.

25 El suministro de un polinucleótido a una célula es mediado por el polímero activo en la membrana que altera o desestabiliza la membrana plasmática o una membrana de vesícula interna (tal como un endosoma o lisosoma), incluyendo la formación de un poro en la membrana, o la alteración de vesículas endosomales o lisosomales permitiendo de esta forma la liberación del contenido de la vesícula en el citoplasma celular.

#### Endosomolítico

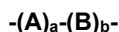
30 Los polímeros endosomolíticos son polímeros que, en respuesta a un cambio de pH, son capaces de producir la alteración o lisis de un endosoma o permitir la liberación de un compuesto normalmente impermeable a la membrana celular, tal como un polinucleótido o proteína, de una vesícula encerrada por membrana interna celular, tal como un endosoma o lisosoma. Los polímeros endosomolíticos sufren un cambio en sus propiedades fisicoquímicas a lo largo de un intervalo de pH fisiológicamente relevante (normalmente pH 5,5 - 8). El cambio puede ser un cambio en la solubilidad del polímero o la capacidad de interactuar con otros compuestos o membranas como resultado de un cambio en la carga, hidrofobicidad o hidrofiliidad. Los polímeros endosomolíticos de ejemplo tienen grupos o enlaces lábiles frente al pH. Por lo tanto, un polímero activo en la membrana enmascarado reversiblemente, en el que los agentes de enmascaramiento están unidos al polímero por enlaces lábiles frente al pH, se puede considerar que es un polímero endosomolítico.

40 Copolímeros aleatorios activos en la membrana anfipáticas

Las poliaminas activas en la membrana anfipáticas de la invención comprenden: poliaminas activas en la membrana anfipáticas (heteropolímeros aleatorios).

45 Para los copolímeros de la invención, las dos o más especies monómeras consisten como mínimo en: un monómero que contiene un grupo colgante amina primaria o secundaria y un monómero que contiene un grupo colgante hidrófobo. En una realización más preferida, las dos especies monómeras consisten como mínimo en: un monómero que contiene un grupo colgante amina primaria o secundaria y un monómero que contiene un grupo colgante hidrófobo inferior. Como se usa en la presente memoria, un grupo colgante es un grupo compuesto de los átomos unidos a un polímero pero cuyos enlaces no son necesarios para la propagación de la longitud del polímero, es decir, ni los átomos ni los enlaces de un grupo colgante son parte de la cadena principal o esqueleto de un polímero al cual está unido el grupo.

50 Los copolímeros de poliaminas activas en la membrana anfipáticas de la invención son el producto de la copolimerización de dos o más especies monómeras. En una realización, los heteropolímeros activos en la membrana anfipáticos de la invención, tienen la estructura general:



55 en donde, **A** contiene un grupo funcional colgante amina primaria o secundaria y **B** contiene un grupo colgante hidrófobo inferior (que contiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono). **a** y **b** son números enteros >0. Para

ayudar en la síntesis, durante la polimerización se pueden usar monómeros que contienen amina protegida, tales como monómeros con amina protegida con ftalimido o protegida con BOC. Los grupos protectores de amina se eliminan después de la polimerización para dar aminas. Es aceptable la incorporación de monómeros, de hasta 10%, que contienen grupos colgantes hidrófobos medios o superiores (7 o más átomos de carbono). También es aceptable la incorporación de especies monómeras adicionales en cantidades pequeñas (<5%). Por ejemplo, los polímeros también pueden tener monómeros que contienen grupos reactivos adicionales. Los monómeros que contienen grupos reactivos se pueden usar para unir componentes al polímero después de la síntesis del polímero. Un monómero puede tener un grupo reactivo que no participe en la reacción de polimerización. Un monómero también puede tener un grupo reactivo que está protegido. El grupo protector previene la reacción del grupo reactivo durante la polimerización. Después de la polimerización, se elimina el grupo reactivo.

En otra realización, se usa un terpolímero, un polímero que tiene al menos tres especies monómeras diferentes, como el polímero de suministro. Para los terpolímeros de la invención, las tres especies monómeras consisten como mínimo en: un monómero que contiene un grupo colgante amina primaria o secundaria, un monómero que contiene un primer grupo colgante hidrófobo, y un monómero que contiene un segundo grupo colgante hidrófobo, en donde el primer y segundo grupos colgantes hidrófobos son diferentes. En una realización más preferida, las tres o más especies monómeras consisten como mínimo en: un monómero que contiene un grupo amina primaria o secundaria, un monómero que contiene un grupo colgante hidrófobo inferior, y un monómero que contiene un grupo colgante hidrófobo medio o superior.

En una realización, los terpolímeros activos en la membrana anfipáticos de la invención, tienen la estructura general:



en donde, **A** contiene un grupo funcional colgante amina primaria o secundaria, **B** contiene un grupo colgante hidrófobo inferior (que contiene de 2 a aproximadamente 6 átomos de carbono), y **C** contiene un grupo colgante hidrófobo superior (que contiene 12 o más átomos de carbono). **a**, **b**, y **c** son números enteros >0. Para ayudar en la síntesis, durante la polimerización se pueden usar monómeros que contienen amina protegida, tales como monómeros con amina protegida con ftalimido o protegida con BOC. Los grupos protectores de amina se eliminan después de la polimerización para dar aminas. Es posible la incorporación de especies monómeras adicionales en cantidades pequeñas (<5%). Por ejemplo, los polímeros también pueden tener monómeros hidrófobos adicionales o monómeros que contienen grupos reactivos. Los monómeros que contienen grupos reactivos se pueden usar para unir componentes al polímero después de la síntesis del polímero. Un monómero puede tener un grupo reactivo que no participe en la reacción de polimerización. Un monómero también puede tener un grupo reactivo que está protegido. El grupo protector previene la reacción del grupo reactivo durante la polimerización. Después de la polimerización, se elimina el grupo protector.

Los grupos hidrófobos son preferiblemente hidrocarburos, que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, pueden estar permitidas sustituciones no polares o heteroátomos no polares que mantienen la hidrofobicidad, e incluyen, por ejemplo, flúor. El término incluye grupo alifáticos, grupos aromáticos, grupos acilo, grupos alquilo, grupos alquenoilo, grupos alquinoilo, grupos arilo, grupos aralquilo, grupos aralquenoilo y grupos aralquinoilo, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico. La expresión grupo hidrófobo también incluye: esteroides, esteroides, colesterol y derivados de esteroides y colesterol. Como se usa en la presente memoria, los monómeros o grupos hidrófobos inferiores comprenden grupos hidrófobos que tienen de dos (2) a seis (6) átomos de carbono. Como se usa en la presente memoria, los monómeros o grupos hidrófobos medios comprenden grupos hidrófobos que tienen de siete (7) a once (11) átomos de carbono. Como se usa en la presente memoria, los monómeros o grupos hidrófobos superiores comprenden grupos hidrófobos que tienen de doce (12) a treinta y seis (36) átomos de carbono.

Las propiedades biofísicas de los polímeros anfipáticos se determinan por las clases de especies monómeras polimerizadas, la relación con la que se incorporan en el polímero, y el tamaño del polímero. Se pueden hacer diferentes polímeros alterando la relación de alimentación de monómeros en la reacción de polimerización, o alterando los grupos usados para modificar la cadena principal del polímero. Aunque la relación de los monómeros incorporados en un polímero puede ser la misma que la relación de alimentación de monómeros, las relaciones pueden ser diferentes. Se incorporen los monómeros a la relación de alimentación o en una relación diferente, se puede alterar la relación de alimentación de los monómeros para conseguir una relación de incorporación de monómeros deseada.

La relación de grupos amina a grupos hidrófobos se selecciona para formar un polímero soluble en agua con actividad alteradora de la membrana. Los polímeros activos en la membrana preferidos de la invención son solubles en agua en  $\geq 1$  mg/ml,  $\geq 5$  mg/ml,  $\geq 10$  mg/ml,  $\geq 15$  mg/ml,  $\geq 20$  mg/ml,  $\geq 25$  mg/ml, y  $\geq 30$  mg/ml. Los polímeros activos en la membrana preferidos de la invención son tensioactivos. Los polímeros activos en la membrana de la invención preferiblemente tienen un tamaño en el intervalo de aproximadamente 3 kDa a aproximadamente 300 kDa. Debido a que los polímeros son anfipáticos, se autoasocian en disolución acuosa, con una concentración de asociación crítica  $\leq 1$  mg/ml.



En una realización, la relación de incorporación de monómeros para los copolímeros de poliamina activos en la membrana es de 4-8 monómeros amina:3-5 monómeros hidrófobos inferiores. En otra realización, la relación de incorporación de monómeros para las poliaminas activas en la membrana es 5,4-7,5 monómeros amina:3-3,5 monómeros hidrófobos inferiores. En otra realización, la relación de incorporación de monómeros para las poliaminas activas en la membrana es de aproximadamente 2 monómeros de amina a aproximadamente 1 monómero hidrófobo inferior. En una realización, los grupos de los monómeros hidrófobos consisten en grupos alquilo.

En una realización, la relación de incorporación de monómeros para los terpolímeros de poliamina activos en la membrana es de 4-8 monómeros amina:3-5 monómeros hidrófobos inferiores:1 monómero hidrófobo superior. En otra realización, la relación de incorporación de monómeros para las poliaminas activas en la membrana es 5,4-7,5 monómeros amina: 3-3,5 monómeros hidrófobos inferiores: 1 monómero hidrófobo superior. En otra realización, la relación de incorporación de monómeros para las poliaminas activas en la membrana es de aproximadamente 6 monómeros amina a aproximadamente 3 monómeros hidrófobos inferiores a aproximadamente 1 monómero hidrófobo superior. En una realización, los grupos hidrófobos de los monómeros hidrófobos consisten en grupos alquilo.

En una realización, los copolímeros con amina/grupo hidrófobo inferior se sintetizan usando monómeros en una relación de alimentación de aproximadamente 4-8 monómeros amina:aproximadamente 3-5 monómeros alquilo inferior. En otra realización, los copolímeros con amina/grupo hidrófobo inferior se pueden sintetizar usando monómeros en una relación de alimentación de aproximadamente 15 monómeros amina: 4 monómeros con grupo hidrófobo inferior.

En una realización, los terpolímeros con amina/grupo hidrófobo inferior/grupo hidrófobo superior se sintetizan usando monómeros en una relación de alimentación de aproximadamente 4-8 monómeros amina:aproximadamente 3-5 monómeros alquilo inferior:1 monómero alquilo superior. En otra realización, los terpolímeros con amina/grupo hidrófobo inferior/grupo hidrófobo superior se pueden sintetizar usando monómeros en una relación de alimentación de aproximadamente 15 monómeros amina: 4 monómeros con grupo hidrófobo inferior: 1 monómero con grupo hidrófobo superior.

En una realización, las poliaminas activas en la membrana particularmente adecuadas comprenden copolímeros que tienen monómeros que contienen amina, monómeros que contienen butilo y monómeros que contienen grupo hidrófobo superior, en donde el grupo hidrófobo superior contiene 12-18 átomos de carbono. Las poliaminas activas en membrana particularmente adecuadas comprenden terpolímeros aleatorios de poli(éter vinílico) o terpolímeros aleatorios de poliacrilato.

En otra realización, las poliaminas activas en la membrana particularmente adecuadas comprenden copolímeros que tienen monómeros que contienen amina, monómeros que contienen grupo hidrófobo inferior. Las poliaminas activas en membrana particularmente adecuadas comprenden copolímeros aleatorios de poli(éter vinílico) o copolímeros aleatorios de poliacrilato.

Las poliaminas activas en la membrana particularmente adecuadas comprenden copolímeros que tienen monómeros que contienen amina y monómeros que contienen butilo. Las poliaminas activas en membrana particularmente adecuadas comprenden copolímeros aleatorios de poli(éter vinílico) o copolímeros aleatorios de poliacrilato.

#### 40 Polímeros biodegradables

Un polímero puede tener uno o más enlaces escindibles. Si los enlaces escindibles se escinden de forma natural en condiciones fisiológicas o condiciones fisiológicas celulares, el polímero es biodegradable. El enlace biodegradable puede estar en la cadena principal o en una cadena lateral. Si el enlace escindible está en la cadena principal, la escisión del enlace produce una disminución de la longitud del polímero y la formación de dos moléculas. Si el enlace escindible está en la cadena lateral, entonces la escisión del enlace produce la pérdida de átomos de la cadena lateral del polímero. Para polímeros activos en la membrana, la biodegradación del polímero producirá una disminución de la actividad del polímero en la membrana. Como se usa en la presente memoria, el término biodegradable significa que el polímero se degradará a lo largo del tiempo por acción de enzimas, por acción hidrolítica y/o por otros mecanismos similares en el cuerpo. Los enlaces biodegradables son aquellos enlaces que se escinden por procesos biológicos e incluyen, pero no se limitan a: ésteres, fosfodiésteres, algunos enlaces peptídicos, y combinaciones de los mismos. Los ésteres sufren hidrólisis y también son escindidos catalíticamente por esterases. Los fosfodiésteres son escindidos por nucleasas. Los enlaces peptídicos son escindidos por peptidasas. En particular, se degrada o escinde la cadena principal del polímero, o se degradan o escinden las cadenas laterales (grupos colgantes), del polímero. Los enlaces biodegradables en los polímeros biodegradables se pueden escindir, en condiciones fisiológicas, con una semivida menor de 45 min, mayor de 45 min, mayor de 2 horas, mayor de 8 horas, mayor de 24 horas o mayor de 48 horas. Aunque los polímeros biodegradables son útiles para el suministro in vivo, el polímero debe ser suficientemente estable para formar un polímero de tamaño suficiente en disolución acuosa. Además, la velocidad de escisión de un enlace biodegradable debe ser más lenta que el enlace lábil usado para unir un agente de enmascaramiento al polímero. En una realización preferida, la

degradación de un polímero biodegradable ocurre a una velocidad más lenta que la escisión de los agentes de enmascaramiento.

#### Enmascaramiento

5 Los polímeros de suministro de la invención comprenden poliaminas activas en la membrana anfipáticas modificadas reversiblemente, en donde la modificación reversible inhibe la actividad en la membrana, neutraliza la poliamina para reducir carga positiva y formar un polímero de carga casi neutra, proporciona direccionamiento específico del tipo de célula e inhibe las interacciones no específicas del polímero. La poliamina se modifica reversiblemente por modificación reversible de las aminas en la poliamina.

10 Las poliaminas activas en la membrana de la invención son capaces de alterar las membranas plasmáticas o membranas lisosómicas/endocíticas. Esta actividad en la membrana es una característica esencial para el suministro celular del polinucleótido. Sin embargo, la actividad en la membrana conduce a toxicidad cuando el polímero se administra in vivo. Las poliaminas también interactúan fácilmente con muchos componentes aniónicos in vivo, conduciendo a biodistribución indeseada. Por lo tanto, el enmascaramiento reversible de la actividad en la membrana de la poliamina es necesaria para usar in vivo. Este enmascaramiento se consigue por la unión reversible de agentes de enmascaramiento a la poliamina activa en la membrana, para formar un polímero activo en la membrana enmascarado reversiblemente, es decir, un polímero de suministro. Además de inhibir la actividad en la membrana, los agentes de enmascaramiento protegen al polímero de interacciones no específicas, reducen interacciones en el suero, aumentan el tiempo de circulación y proporcionan interacciones específicas de célula, es decir, direccionamiento.

20 Es una característica esencial de los agentes de enmascaramiento el que, en agregados, inhiben la actividad en la membrana del polímero, protegen al polímero de interacciones no específicas (reducen las interacciones en el suero, aumentan el tiempo de circulación), y proporcionan direccionamiento a hepatocitos in vivo. La poliamina activa en la membrana es activa en la membrana en el estado no modificado (no enmascarada) y no es activa en la membrana (inactivada) en el estado modificado (enmascarada). Se une un número suficiente de agentes de enmascaramiento al polímero para conseguir el nivel deseado de inactivación. El nivel deseado de modificación de un polímero por unión del o de los agentes de enmascaramiento se determina fácilmente usando ensayos de actividad del polímero adecuados. Por ejemplo, si el polímero tiene actividad en la membrana en un ensayo dado, se une al polímero un nivel suficiente de agentes de enmascaramiento para conseguir el nivel deseado de inhibición de la actividad en la membrana en ese ensayo. El enmascaramiento requiere la modificación de  $\geq 50\%$ ,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$ , o  $\geq 80\%$  de los grupos amina en el polímero, determinado por la cantidad de aminas en el polímero en ausencia de cualquier agente de enmascaramiento. También es una característica preferida de los agentes de enmascaramiento que su unión al polímero reduce la carga positiva del polímero, formando así un polímero de suministro más neutro. Es deseable que el polímero enmascarado retenga la solubilidad acuosa.

35 Como se usa en la presente memoria, una poliamina activa en la membrana está enmascarada si el polímero modificado no presenta actividad en la membrana y presenta direccionamiento específico de célula (es decir, de hepatocitos) in vivo. Una poliamina activa en la membrana está enmascarada reversiblemente si la escisión de los enlaces que unen los agentes de enmascaramiento al polímero produce el restablecimiento de las aminas en el polímero, restableciendo así la actividad en la membrana.

40 Otra característica esencial es que los agentes de enmascaramiento están covalentemente unidos a la poliamina activa en la membrana por enlaces reversibles en condiciones fisiológicas. Al usar uniones o enlaces reversibles en condiciones fisiológicas, los agentes de enmascaramiento se pueden escindir del polímero in vivo, desenmascarando de esta forma al polímero y restableciendo la actividad del polímero no enmascarado. Seleccionando una unión reversible adecuada, se puede formar un conjugado que restablece la actividad del polímero activo en la membrana después de haber sido suministrado o dirigido a un tipo de célula deseado o sitio celular. La reversibilidad de las uniones proporciona la activación selectiva del polímero activo en la membrana. Las uniones covalentes reversibles contienen enlaces reversibles o lábiles que se pueden seleccionar del grupo que comprende: enlaces lábiles en condiciones fisiológicas, enlaces lábiles en condiciones fisiológicas celulares, enlaces lábiles frente al pH, enlaces muy lábiles frente al pH y enlaces extremadamente lábiles frente al pH.

50 Como se usa en la presente memoria, un agente de enmascaramiento comprende un compuesto que tiene un resto que se dirige al ASGPr o un estabilizante estérico y un grupo reactivo con amina, en donde la reacción del grupo reactivo con amina con una amina en un polímero da como resultado la unión del resto que dirige al ASGPr o estabilizante estérico al polímero por un enlace covalente lábil en condiciones fisiológicas. Un grupo que dirige al ASGPr es un grupo, típicamente un sacárido, que tiene afinidad por el receptor de asialoglicoproteína. Un estabilizante estérico preferido es un polietilenglicol (PEG). Los agentes de enmascaramiento preferidos de la invención son capaces de modificar el polímero (forman un enlace reversible con el polímero) en disolución acuosa. Un grupo reactivo con amina preferido comprende un anhídrido maleico disustituido. Un agente de enmascaramiento preferido se representa por la estructura:



en donde, en el que R<sup>1</sup> es un grupo alquilo tal como un grupo metilo (-CH<sub>3</sub>), grupo etilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) o grupo propilo (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) para formar un anhídrido alquilmaleico sustituido) y R<sup>2</sup> comprende un resto que se dirige al receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) o un estabilizante estérico.

- 5 La poliamina activa en la membrana se puede conjugar con agentes de enmascaramiento en presencia de un exceso de agentes de enmascaramiento. El exceso de agente de enmascaramiento se puede eliminar del polímero de suministro conjugado antes de la administración del polímero de suministro.

#### Estabilizante estérico

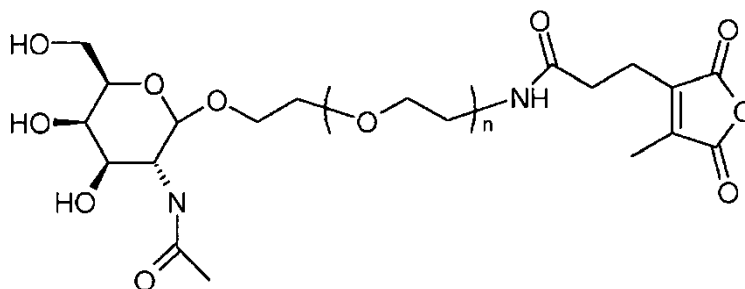
- 10 Como se usa en la presente memoria, un estabilizante estérico es un polímero hidrófilo no iónico (sea natural, sintético o no natural) que previene o inhibe las interacciones intramoleculares o intermoleculares de un polímero al cual está unido, en relación al polímero que no contiene estabilizante estérico. Un estabilizante estérico impide a un polímero al que está unido que participe en interacciones electrostáticas. La interacción electrostática es la asociación no covalente de dos o más sustancias debido a fuerzas atractoras entre cargas positivas y negativas. Los estabilizantes estéricos pueden inhibir la interacción de componentes de la sangre y por lo tanto la opsonización, fagocitosis y absorción por el sistema reticuloendotelial. Por lo tanto, los estabilizantes estéricos aumentan el tiempo de circulación de moléculas a las que están unidas. Los estabilizantes estéricos también pueden inhibir la agregación de un polímero. Un estabilizante estérico preferido es un polietilenglicol (PEG) o derivado de PEG. Como se usa en la presente memoria, un PEG preferido puede tener aproximadamente 1-500 monómeros de etilenglicol, 2-20 monómeros de etilenglicol, 5-15 monómeros de etilenglicol, o aproximadamente 10 monómeros de etilenglicol.
- 20 Como se usa en la presente memoria un PEG preferido también puede tener un peso molecular medio de aproximadamente 85-20.000 Daltons (Da), aproximadamente 200-1000 Da, aproximadamente 200-750 Da, o aproximadamente 550 Da. Como se usa en la presente memoria, los estabilizantes estéricos previenen o inhiben interacciones intramoleculares o intermoleculares de un polímero al que están unidos, en relación con el polímero que no contiene estabilizante estérico en disolución acuosa.

- 25 Resto que dirige al ASGPr

- Los restos o grupos directores potencian las propiedades farmacocinéticas o de biodistribución de un conjugado al que están unidos, para mejorar la distribución específica de célula y absorción específica de célula del conjugado. La galactosa y derivados de galactosa se han usado para dirigir moléculas a hepatocitos in vivo a través de su unión al receptor de asialoglicoproteína expresado en la superficie de hepatocitos (ASGPr). Como se usa en la presente memoria, un resto que dirige al ASGPr comprende una galactosa o derivado de galactosa que tiene afinidad por el ASGPr igual o mayor que el de la galactosa. La unión de los restos directores galactosa al o a los ASGPr facilita el direccionamiento específico de célula del polímero suministrado a hepatocitos y la endocitosis del polímero de suministro en los hepatocitos.

- 35 Los restos que dirigen al ASGPr se pueden seleccionar del grupo que comprende: lactosa, galactosa, N-acetilgalactosamina (GalNAc), galactosamina, N-formilgalactosamina, N-acetil-galactosamina, N-propionilgalactosamina, N-n-butanoilgalactosamina, y N-iso-butanoilgalactosamina (Iobst, S.T. y Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686). Los restos que dirigen al ASGPr pueden ser monómeros (p. ej., tienen una sola galactosamina) o multiméricos (p. ej., tienen múltiples galactosaminas).

- 40 En algunas realizaciones, el resto director galactosamina está unido al grupo reactivo con amina por un conector PEG como se ilustra mediante la estructura:



en donde n es un número entero entre 1 y 19.

En una realización, la poliamina activa en la membrana se enmascara de forma reversible por unión de agentes de enmascaramiento con resto que dirige al ASGPr, a  $\geq 50\%$ ,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$  o  $\geq 80\%$  de las aminas en la poliamina. En otra realización, la poliamina activa en la membrana se enmascara de forma reversible por unión de agentes de enmascaramiento con resto que dirige al ASGPr, a  $\geq 50\%$ ,  $\geq 60\%$ ,  $\geq 70\%$  o  $\geq 80\%$  de aminas en la poliamina. En otra realización, los agentes de enmascaramiento con resto que dirige al ASGPr comprenden un resto que dirige al ASGPr unido a un grupo reactivo con amina por un conector PEG. Para el enmascaramiento de la poliamina activa en la membrana tanto con agentes de enmascaramiento con resto que dirige al ASGPr como con agentes de enmascaramiento PEG, una relación preferida de PEG a resto que dirige al ASGPr es aproximadamente 0-4:1, más preferiblemente aproximadamente 0,5-2:1. En otra realización, hay aproximadamente 1,3-2 agentes de enmascaramiento PEG por aproximadamente 1 agente de enmascaramiento derivado de galactosa.

#### Carga superficial

El potencial Z es una propiedad física que presenta una partícula en suspensión y está estrechamente relacionada con la carga superficial. En medio acuoso, el pH de la muestra es uno de los factores más importantes que afectan al potencial zeta. Cuando la carga se basa en la protonación/desprotonación de bases/ácidos, la carga depende del pH. Por lo tanto, un valor de potencial zeta debe incluir las condiciones en disolución, en especial el pH, para ser importante. Para partículas típicas, la magnitud del potencial zeta da una indicación de la estabilidad del potencial del sistema coloidal. Si todas las partículas en suspensión tienen un potencial zeta grande negativo o positivo, tendrán tendencia a repelerse entre sí, y las partículas no tendrán tendencia a juntarse. Sin embargo, si las partículas tienen valores de potencial zeta bajos, no habrá fuerza para impedir que las partículas se junten y floculen. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables para partículas típicas en general se toma a +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales zeta más positivos que +30 mV o más negativos que -30 mV normalmente se consideran estables. Los polímeros de suministro de la invención descrita presentan un potencial zeta de 20 mV a -20 mV en disolución salina fisiológica y pH 8, pero son estables coloidalmente en solución acuosa y no floclan.

La carga positiva, o potencial zeta, de una poliamina activa en la membrana, se reduce por modificación con los agentes de enmascaramiento. La carga del polímero, en especial la carga positiva, puede dar lugar a interacciones no deseadas con componentes del suero o células no diana. La carga superficial positiva también tiene una función en la actividad en la membrana potenciando la interacción del polímero con membranas celulares con carga negativa. Por lo tanto, son preferidos los polímeros de suministro con carga neta o potencial zeta casi neutro para el suministro in vivo de polinucleótidos. Los polímeros de suministro de la invención, poliaminas activas en la membrana, enmascaradas por unión reversible de agentes de enmascaramiento con resto que dirige al ASGPr y agentes de enmascaramiento estabilizantes estéricos, tienen una carga superficial aparente casi neutra y son estables en el suero. Más específicamente, los polímeros de suministro de la invención tienen un potencial zeta, medido a pH 8, entre +30 y -30 mV, entre +20 y -20 mV, entre +10 y -10 mV, o entre +5 y -5 mV. A pH 7, se espera que la carga neta del conjugado sea más positiva que a pH 8. La carga neta, o carga superficial es un factor importante para las aplicaciones in vivo.

#### Unión lábil

Una unión o conector es una conexión entre dos átomos que une un grupo o segmento químico de interés a otro grupo o segmento químico de interés por uno o más enlaces covalentes. Por ejemplo, una unión puede conectar un agente de enmascaramiento a un polímero. La formación de una unión puede conectar dos moléculas separadas en una sola molécula o puede conectar dos átomos en la misma molécula. La unión puede ser de carga neutra o puede llevar una carga positiva o negativa. Una unión reversible o lábil contiene un enlace reversible o lábil. Una unión puede incluir opcionalmente un espaciador que aumenta la distancia entre los dos átomos unidos. Un espaciador puede añadir además flexibilidad y/o longitud a la unión. Los espaciadores pueden incluir, pero no se limitan a grupos alquilo, grupos alquenilo, grupos alquinilo, grupos arilo, grupos aralquilo, grupos aralquenilo, grupos aralquinilo; cada uno de los cuales puede contener uno o más heteroátomos, heterociclos, aminoácidos, nucleótidos y sacáridos. Los grupos espaciadores son bien conocidos en la técnica y no se pretende que la lista previa limite el alcance de la invención.

Un enlace reversible o lábil es un enlace covalente distinto de un enlace covalente con un átomo de hidrógeno, que se puede romper o escindir selectivamente en condiciones que no romperán o escindirán otros enlaces covalentes en la misma molécula. Más específicamente, un enlace reversible o lábil es un enlace covalente que es menos estable (termodinámicamente) o se rompe más rápidamente (cinéticamente) en condiciones adecuadas que otros enlaces covalentes no lábiles en la misma molécula. La escisión de un enlace lábil en una molécula puede dar lugar a la formación de dos moléculas. Para los expertos en la técnica, la escisión o la labilidad de un enlace en general se describe en términos de semivida ( $t_{1/2}$ ) de escisión del enlace (tiempo necesario para que se escindan la mitad de los enlaces). Por lo tanto, los enlaces reversibles o lábiles abarcan enlaces que se pueden escindir selectivamente más rápidamente que otros enlaces en la molécula.

Las condiciones adecuadas se determinan por el tipo de enlace lábil y son bien conocidas en química orgánica. Un enlace lábil puede ser sensible al pH, a condiciones o agentes oxidantes o reductores, temperatura, concentración salina, la presencia de una enzima (tal como esterases, incluyendo nucleasas y proteasas), o la presencia de un

agente añadido. Por ejemplo, el aumento o disminución de pH son las condiciones adecuadas para un enlace lábil frente al pH.

La velocidad a la que un grupo lábil sufrirá transformación se puede controlar alterando los constituyentes químicos de la molécula que contiene el grupo lábil. Por ejemplo, la adición de restos químicos particulares (p. ej., aceptores o donadores de electrones) cerca del grupo lábil puede afectar a las condiciones particulares (p. ej., pH) a las que se producirá la transformación química.

Como se usa en la presente memoria, un enlace lábil en condiciones fisiológicas es un enlace lábil que se puede escindir en condiciones que se encuentran normalmente o análogas a las encontradas en el cuerpo de un mamífero. Los grupos de uniones lábiles en condiciones fisiológicas se seleccionan de modo que sufren una transformación química (p. ej., escisión) cuando están presentes en determinadas condiciones fisiológicas.

Como se usa en la presente memoria, un enlace lábil en condiciones fisiológicas celulares es un enlace lábil que se puede escindir en condiciones intracelulares de mamífero. Las condiciones intracelulares de mamífero incluyen condiciones químicas tales como pH, temperatura, condiciones o agentes oxidantes o reductores, y concentración salina que se encuentran o análogas a las que se encuentran en células de mamífero. Las condiciones intracelulares de mamífero también incluyen la presencia de actividad enzimática normalmente presente en una célula de mamífero, tal como de enzimas proteolíticas o hidrolíticas. Un enlace lábil en condiciones fisiológicas celulares también se puede escindir en respuesta a la administración de un agente exógeno farmacéuticamente aceptable. Los enlaces lábiles en condiciones fisiológicas que se escinden en condiciones adecuadas con una semivida de menos de 45 min se consideran muy lábiles. Los enlaces lábiles en condiciones fisiológicas que se escinden en condiciones adecuadas con una semivida de menos de 15 min se consideran extremadamente lábiles.

La transformación química (escisión del enlace lábil) se puede iniciar por la adición de un agente farmacéuticamente aceptable a la célula o puede ocurrir espontáneamente cuando una molécula que contiene el enlace lábil llega a un entorno intra y/o extracelular adecuado. Por ejemplo, un enlace lábil frente al pH se puede escindir cuando la molécula entra en un endosoma acidificado. Por lo tanto, un enlace lábil frente al pH se puede considerar que es un enlace escindible en endosomas. Los enlaces escindibles por enzimas se pueden escindir cuando son expuestos a enzimas tales como las presentes en un endosoma o lisosoma o en el citoplasma. Un enlace disulfuro se puede escindir cuando la molécula entra en el entorno más reductor del citoplasma celular. Por lo tanto, se puede considerar que un disulfuro es un enlace escindible en el citoplasma.

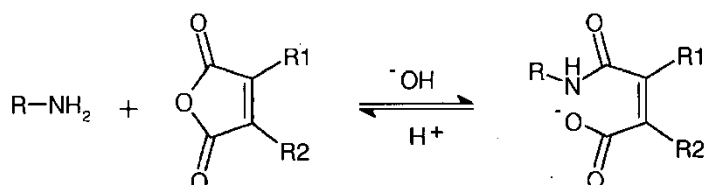
Como se usa en la presente memoria, un enlace lábil frente al pH es un enlace lábil que se rompe selectivamente en condiciones ácidas (pH<7). Dichos enlaces también se pueden denominar enlaces lábiles en endosomas, puesto que los endosomas y lisosomas de las células tienen un pH menor que 7. La expresión lábil frente al pH incluye enlaces que son lábiles frente al pH, muy lábiles frente al pH y extremadamente lábiles frente al pH.

La reacción de un anhídrido con una amina forma una amida y un ácido. Para muchos anhídridos, la reacción inversa (formación de un anhídrido y amina) es muy lenta y energéticamente desfavorable. Sin embargo, si el anhídrido es un anhídrido cíclico, la reacción con una amina da una amida-ácido, una molécula en la que la amida y el ácido están en la misma molécula. La presencia de ambos grupos reactivos (la amida y el ácido carboxílico) en la misma molécula acelera la reacción inversa. En particular, el producto de aminas primarias con anhídrido maleico y derivados de anhídrido maleico, ácidos maleámicos, devuelve a la amina y anhídrido de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^{13}$  veces más rápido que sus análogos no cíclicos (Kirby 1980).

Reacción de una amina con un anhídrido para formar una amida y un ácido.



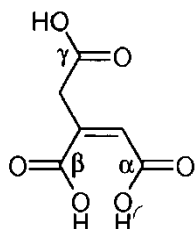
Reacción de una amina con un anhídrido cíclico para formar una amida-ácido.



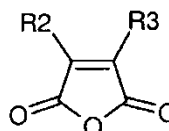
La escisión de la amida-ácido para formar una amina y un anhídrido depende del pH y se acelera mucho a pH ácido. Esta reactividad dependiente del pH se puede explotar para formar enlaces y conectores lábiles frente al pH reversibles. El ácido cis-aconítico se ha usado como dicha molécula conectora sensible al pH. El carboxilato  $\alpha$  se acopla primero a una molécula. En una segunda etapa, el carboxilato  $\beta$  se acopla a una segunda molécula para

formar un acoplamiento de las dos moléculas sensible al pH. La semivida para la escisión de este conector a pH 5 es entre 8 y 24 h.

Estructuras del anhídrido cis-aconítico y anhídrido maleico.



ácido aconítico



anhídrido maleico

5 El pH al que se produce la escisión se controla por la adición de constituyentes químicos al resto lábil. La velocidad de conversión de los ácidos maleámico en aminos y anhídridos maleicos depende mucho de la sustitución (R2 y R3) del sistema de anhídrido maleico. Cuando R2 es metilo, la velocidad de conversión es 50 veces mayor que cuando R2 y R3 son hidrógeno. Cuando hay sustituciones alquilo tanto en R2 como en R3 (p. ej., anhídrido 2,3-dimetilmaleico) al aumento de velocidad es espectacular: 10.000 más rápido que en el anhídrido maleico no sustituido. El enlace de maleamato formado por la modificación de una amina con anhídrido 2,3-dimetilmaleico se escinde para restablecer el anhídrido y la amina con una semivida de entre 4 y 10 min a pH 5. Se prevé que si R2 y R3 son grupos mayores que el hidrógeno, la velocidad de conversión del amida-ácido en amina y anhídrido será más rápida que si R2 y/o R3 son hidrógeno.

15 Enlace muy lábil frente al pH: Un enlace muy lábil frente al pH tiene una semivida para la escisión a pH 5 menor que 45 min. La construcción de enlaces muy lábiles frente al pH es bien conocida en la técnica química.

Enlaces extremadamente lábiles frente al pH: Un enlace extremadamente lábil frente al pH tiene una semivida para la escisión a pH 5 menor que 15 min. La construcción de enlaces extremadamente lábiles frente al pH es bien conocida en la técnica química.

20 Los anhídridos cíclicos disustituídos son particularmente útiles para la unión de agentes de enmascaramiento a poliaminas activas en la membrana de la invención. Proporcionan uniones lábiles frente al pH en condiciones fisiológicas, modifican aminas fácilmente y restablecen esas aminas por escisión en el pH reducido que se encuentra en los endosomas y lisosomas celulares. Segundo, el grupo ácido carboxílico  $\alpha$  o  $\beta$  creado tras la reacción con una amina, parece que contribuye solo aproximadamente 1/20ª parte de la carga negativa esperada al polímero (Rozema et al. *Bioconjugate Chemistry* 2003). Por lo tanto, la modificación de la poliamina con los anhídridos maleicos disustituídos neutraliza eficazmente la carga positiva de la poliamina en lugar de crear un polímero con carga negativa alta. Los polímeros casi neutros son preferidos para el suministro in vivo.

Polimerización por etapas

30 En la etapa de polimerización, la polimerización se produce en un modo por etapas. El crecimiento del polímero se produce por reacción entre monómeros, oligómeros y polímeros. No se necesita iniciador puesto que ocurre la misma reacción en todo el proceso, y no hay etapa de terminación de modo que los grupos terminales todavía están reactivos. La velocidad de polimerización disminuye al consumirse los grupos funcionales.

35 Se puede crear un polímero usando la polimerización por etapas usando monómeros que tienen dos grupos reactivos (A y B) en el mismo monómero (heterobifuncional), en donde A comprende un grupo reactivo y B comprende un grupo reactivo con A (un grupo reactivo que forma un enlace covalente con A). La polimerización de A-B da  $-[A-B]_n-$ . Los grupos reactivos A y B se pueden unir por un enlace covalente o una pluralidad de enlaces covalentes, formando así el monómero del polímero. También se puede crear un polímero usando la polimerización por etapas, usando monómeros homobifuncionales, de modo que A-A + B-B da  $-[A-A-B-B]_n-$ . En general, estas reacciones pueden implicar acilación o alquilación. Los dos grupos reactivos de un monómero se pueden unir mediante un solo enlace covalente o una pluralidad de enlaces covalentes.

40 Si el grupo reactivo A es una amina entonces B es un grupo reactivo con amina, que se puede seleccionar del grupo que comprende: isotiocianato, isocianato, acilazida, N-hidroxi-succinimida, cloruro de sulfonilo, aldehído (incluyendo formaldehído y glutaraldehído), cetona, epóxido, carbonato, imidoéster, carboxilato activado con una carbodiimida, alquilfosfato, haluros de arilo (difluoro-dinitrobenzono), anhídrido, haluro de ácido, éster de p-nitrofenilo, éster de o-nitrofenilo, éster de pentaclorofenilo, éster de pentafluorofenilo, carbonil-imidazol, carbonil-piridinio, y carbonil-dimetilaminopiridinio. En otras palabras, cuando el grupo reactivo A es una amina entonces B puede ser un agente acilante o alquilante o agente de aminación.

Si el grupo reactivo A es un sulfhidrilo (tiol) entonces B es un grupo reactivo con tiol, que se puede seleccionar del grupo que comprende: derivado de yodoacetilo, maleimida, derivado de aziridina, derivado de acrililo, derivado de fluorobenceno y derivado de disulfuro (tal como disulfuro de piridilo o derivado de ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB)).

5 Si el grupo reactivo A es carboxilato, entonces el grupo reactivo B es un grupo reactivo con carboxilato, que se puede seleccionar del grupo que comprende: diazoacetato y una amina en la que se usa una carbodiimida. Se pueden usar otros aditivos tales como carbonildiimidazol, dimetilaminopiridina (DMAP), N-hidroxisuccinimida o alcohol usando carbodiimida, y DMAP.

Si el grupo reactivo A es un hidroxilo, entonces el grupo reactivo B es un grupo reactivo con hidroxilo, que se puede seleccionar del grupo que comprende: epóxido, oxirano, carbamato activado, éster activado, y haluro de alquilo.

10 Si el grupo reactivo A es un aldehído o cetona, entonces el grupo reactivo B es un grupo reactivo con aldehído o cetona, que se puede seleccionar del grupo que comprende: hidrazina, derivado de hidrazida, amina (para formar una base de Schiff que se puede reducir o no mediante agentes reductores tales como  $\text{NaCNBH}_3$ ), y compuesto de hidroxilo.

15 Se puede crear un polímero usando la polimerización por etapas, usando monómeros bifuncionales y otro agente, de modo que A-A más otro agente da  $-[A-A]_n-$ .

20 Si el grupo reactivo A es un grupo sulfhidrilo (tiol) entonces se puede convertir en enlaces disulfuro mediante agentes oxidantes tales como yodo ( $\text{I}_2$ ), peryodato sódico ( $\text{NaIO}_4$ ), u oxígeno ( $\text{O}_2$ ). Si el grupo reactivo A es una amina, se puede convertir en un tiol por reacción con 2-iminotiolato (reactivo de Traut) que después sufre oxidación y formación de disulfuro. Los derivados de disulfuro (tal como un disulfuro de piridilo o derivado de TNB) también se pueden usar para catalizar la formación de enlaces disulfuro.

Los grupos reactivos A o B en cualquiera de los ejemplos anteriores también pueden ser un grupo fotorreactivo tal como arilazida (incluyendo arilazida halogenada), diazo, benzofenona, alquino o derivado de diazirina.

25 Las reacciones de los grupos amina, hidroxilo, sulfhidrilo o carboxilato dan enlaces químicos que se describen como amidas, amidinas, disulfuros, éteres, ésteres, enaminas, iminas, ureas, isotioureas, isoureas, sulfonamidas, carbamatos, enlaces alquilamina (aminas secundarias), y enlaces sencillos carbono-nitrógeno en los que el carbono está unido a un grupo hidroxilo, tioéter, diol, hidrazona, diazo o sulfona.

#### Polimerización en cadena

30 En la polimerización por reacción en cadena, el crecimiento del polímero se produce por la adición sucesiva de unidades de monómero a un número limitado de cadenas en crecimiento. Los mecanismos de inicio y propagación son diferentes, y normalmente hay una etapa de terminación de la cadena. Las reacciones de polimerización en cadena pueden ser radicálicas, aniónicas o catiónicas. Los monómeros para la polimerización en cadena se pueden seleccionar de los grupos que comprenden: grupos vinilo, éter vinílico, metacrilato, acrilamida y metacrilamida. La polimerización en cadena también se puede llevar a cabo por polimerización por apertura de ciclo o anillo. Se pueden usar diferentes tipos de iniciadores de radicales libres incluyendo, pero no limitado a peróxidos, hidroxiperóxidos, y compuestos azo, tales como dihidrocloruro de 2,2'-azobis(-amidinopropano) (AAP).

35 Un polímero natural es un polímero que se puede encontrar en la naturaleza. Los ejemplos incluyen polinucleótidos, proteínas, colágeno y polisacáridos (almidones, celulosa, glucosaminoglucanos, quitina, agar, agarosa). Un polímero natural se puede aislar de una fuente biológica o puede ser sintético. Un polímero sintético se formula o fabrica por un procedimiento químico "por el hombre" y no es creado por un proceso biológico que ocurre naturalmente. Un polímero no natural es un polímero sintético que no se hace a partir de materiales o monómeros naturales (animales o vegetales) (tales como aminoácidos, nucleótidos y sacáridos). Un polímero puede ser completa o parcialmente natural, sintético o no natural.

#### Conjugado de polinucleótido de ARNi

45 Los autores de la invención han encontrado que la conjugación de un polinucleótido de ARNi con un resto director del polinucleótido, sea un grupo hidrófobo o a una agrupación de galactosas, y la coadministración del conjugado del polinucleótido de ARNi con el polímero de suministro descrito antes, proporciona el suministro funcional, eficaz, del polinucleótido de ARNi a células hepáticas, en particular a hepatocitos, in vivo. Por suministro funcional se entiende que el polinucleótido de ARNi se suministra a la célula y tiene la actividad biológica esperada, la inhibición específica de secuencia de la expresión génica. Muchas moléculas, incluyendo polinucleótidos, administradas a la vasculatura de un mamífero son normalmente depuradas del cuerpo por el hígado. La depuración de un polinucleótido por el hígado en donde el polinucleótido es degradado o procesado de otra forma para la eliminación del cuerpo, y en donde el polinucleótido no produce inhibición específica de secuencia de la expresión génica, no se considera suministro funcional.

55 El conjugado del polinucleótido de ARNi se forma por unión covalente del polinucleótido de ARNi con el resto director del polinucleótido. El polinucleótido se sintetiza o modifica de modo que contiene un grupo reactivo A. El

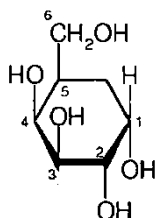
resto director también se sintetiza o modifica de modo que contiene un grupo reactivo **B**. Los grupos reactivos **A** y **B** se seleccionan de modo que se puedan unir por una unión covalente usando métodos conocidos en la técnica.

El resto director se puede unir al extremo 3' o al 5' del polinucleótido de ARNi. Para los polinucleótidos de ARNip, el resto director se puede unir en la cadena codificante o en la cadena de sentido contrario, aunque se prefiere en la cadena codificante.

En una realización, el resto director del polinucleótido consiste en un grupo hidrófobo. Más específicamente, el resto director del polinucleótido consiste en un grupo hidrófobo que tiene al menos 20 átomos de carbono. Los grupos hidrófobos usados como restos directores del polinucleótido se denominan en la presente memoria restos directores hidrófobos. Los grupos hidrófobos adecuados de ejemplo se pueden seleccionar del grupo que comprende: colesterol, dicolesterol, tocoferol, ditocofeol, didecilo, didodecilo, dioctadecilo, isoprenoide y coleamida. Los grupos hidrófobos que tienen 6 o menos átomos de carbono no son eficaces como restos directores de polinucleótido, mientras que los grupos hidrófobos que tienen de 8 a 18 átomos de carbono proporcionan suministro de polinucleótido creciente con el aumento del tamaño del grupo hidrófobo (es decir, aumento del número de átomos de carbono). La unión de un resto director hidrófobo a un polinucleótido de ARNi no proporciona suministro funcional eficaz in vivo del polinucleótido de ARNi en ausencia de la coadministración del polímero de suministro. Aunque otros han descrito que los conjugados de ARNip-colesterol suministran ARNip (ARNip-colesterol) a las células hepáticas in vivo, en ausencia de cualquier vehículo de suministro adicional, son necesarias concentraciones altas de ARNip y la eficacia del suministro es mala. Cuando se combinan con los polímeros de suministro descritos en la presente memoria, el suministro del polinucleótido mejora mucho. Al proporcionar el ARNip-colesterol junto con un polímero de suministro de la invención, la eficacia del ARNip-colesterol aumenta aproximadamente 100 veces.

Los grupos hidrófobos útiles como restos directores de polinucleótidos se pueden seleccionar del grupo que consiste en: grupo alquilo, grupo alquenoilo, grupo alquinilo, grupo arilo, grupo aralquilo, grupo aralquenoilo y grupo aralquinilo, cada uno de los cuales puede ser lineal, ramificado o cíclico, colesterol, derivado de colesterol, esterol, esteroide o derivado de esteroide. Los restos directores hidrófobos son preferiblemente hidrocarburos que contienen solo átomos de carbono e hidrógeno. Sin embargo, pueden estar permitidas sustituciones o heteroátomos que mantengan la hidrofobicidad, por ejemplo flúor. El resto director hidrófobo se puede unir al extremo 3' o 5' del polinucleótido de ARNi usando métodos conocidos en la técnica. Para los polinucleótidos de ARNi que tienen 2 cadenas, tales como los ARNip, el grupo hidrófobo se puede unir a cualquiera de las cadenas.

En otra realización, el resto director del polinucleótido comprende una agrupación de galactosas (resto director de agrupación de galactosas). Como se usa en la presente memoria, una agrupación de galactosas comprende una molécula que tiene de dos a cuatro derivados de galactosa terminales. Como se usa en la presente memoria, la expresión derivado de galactosa incluye tanto galactosa como derivados de galactosa que tienen una afinidad por el receptor de asialoglicoproteína igual o mayor que la de la galactosa. Un derivado de galactosa terminal está unido a una molécula por su carbono C-1. El receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) es único de hepatocitos y se une a glicoproteínas con galactosa termina ramificadas. Una agrupación de galactosas preferida tiene tres galactosaminas o derivados de galactosamina terminales, teniendo cada una afinidad por el receptor de asialoglicoproteína. Una agrupación de galactosas más preferida tiene tres N-acetil-galactosaminas terminales. Otras expresiones comunes en la técnica incluye galactosa triantenaria, galactosa trivalente y trímero de galactosa. Se sabe que las agrupaciones de derivados de galactosa triantenaria se unen al ASGPr con mayor afinidad que las estructuras derivadas de galactosa biantenarias o monoantenarias (Baenziger y Fiete, 1980, *Cell*, 22, 611-620; Connolly et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257, 939-945). La multivalencia es necesaria para lograr afinidad nM. La unión de un solo derivado de galactosa que tiene afinidad por el receptor de asialoglicoproteína no permite el suministro funcional del polinucleótido de ARNi a los hepatocitos in vivo cuando se coadministra con el polímero de suministro.

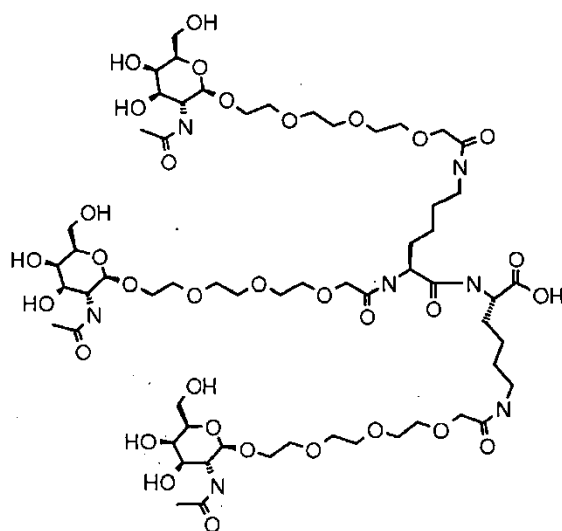


galactosa

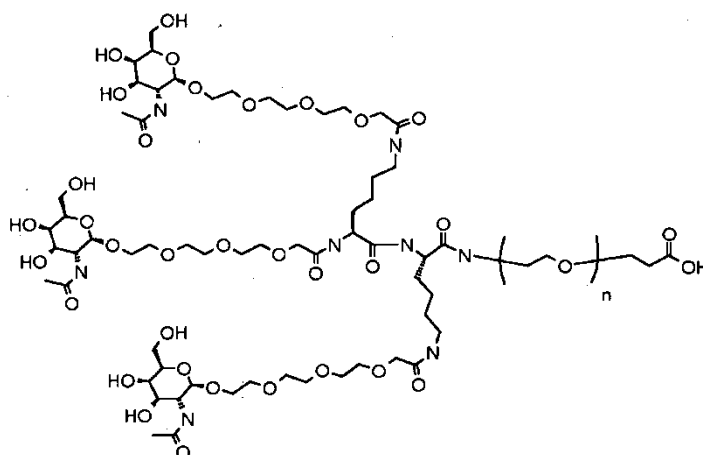
Una agrupación de galactosas contiene tres derivados de galactosa cada uno unido a un punto de ramificación central. Los derivados de galactosa están unidos al punto de ramificación central por los carbonos C-1 de los sacáridos. El derivado de galactosa preferiblemente está unido al punto de ramificación por conectores o espaciadores. Un espaciador preferido es un espaciador hidrófilo flexible (patente de EE.UU. 5885968; Biessen et al. *J. Med. Chem.* 1995 Vol. 39 pág. 1538-1546). Un espaciador hidrófilo flexible preferido es un espaciador de PEG. Un espaciador de PEG preferido es un espaciador PEG<sub>3</sub>. El punto de ramificación puede ser cualquier molécula pequeña que permita la unión de los tres derivados de galactosa y que permita además la unión del punto de



- ramificación al polinucleótido de ARNi. Un punto de ramificación de ejemplo es una di-lisina. Una molécula de di-lisina contiene tres grupos amina por los cuales se pueden unir tres derivados de galactosa y un grupo reactivo con carboxilo a través del cual la di-lisina se puede unir al polinucleótido de ARNi. La unión del punto de ramificación al polinucleótido de ARNi puede ocurrir a través de un conector o espaciador. Un espaciador preferido es un espaciador hidrófilo flexible. Un espaciador hidrófilo flexible preferido es un espaciador de PEG. Un espaciador de PEG preferido es un espaciador PEG<sub>3</sub> (tres unidades de etileno). La agrupación de galactosas se puede unir al extremo 3' o 5' del polinucleótido de ARNi usando métodos conocidos en la técnica. Para los polinucleótidos de ARNi que tienen 2 cadenas, tales como los ARNip, la agrupación de galactosas se puede unir a cualquiera de las cadenas.
- 5
- 10 Un derivado de galactosa preferido es una N-acetil-galactosamina (GalNAc). Otros sacáridos que tienen afinidad por el receptor de la asialoglicoproteína se pueden seleccionar de la lista que comprende: galactosa, galactosamina, N-formilgalactosamina, N-acetilgalactosamina, N-propionil-galactosamina, N-n-butanoilgalactosamina, y N-isobutanoilgalactosamina. Se han estudiado las afinidades de numerosos derivados de galactosa por el receptor de asialoglicoproteína (véase, por ejemplo: lobst, S.T. y Drickamer, K. *J.B.C.* 1996, 271, 6686) o se determinan fácilmente usando métodos típicos en la técnica.
- 15



Una realización de una agrupación de galactosas



Agrupación de galactosas con espaciador PEG entre el punto de ramificación y el ácido nucleico

- El término polinucleótido, o ácido nucleico o poli(ácido nucleico), es un término de la técnica que se refiere a un polímero que contiene al menos dos nucleótidos. Los nucleótidos son las unidades monómeras de los polímeros polinucleótidos. Los polinucleótidos con menos de 120 unidades de monómeros a menudo se llaman oligonucleótidos. Los ácidos nucleicos naturales tienen una cadena principal de desoxirribosa- o ribosa-fosfato. Un polinucleótido no natural o sintético es un polinucleótido que se polimeriza in vitro o en un sistema sin células y contiene las mismas bases o similares, pero puede contener una cadena principal de un tipo distinto de la cadena principal de ribosa- o desoxirribosa-fosfato natural. Los polinucleótidos se pueden sintetizar usando cualquier técnica
- 20

conocida en la materia. Las cadenas principales de polinucleótidos conocidas en la técnica incluyen: PNA (ácidos peptidonucleicos), fosforotioatos, fosforodiamidatos, morfolinós, y otras variantes de la cadena principal de fosfato de ácidos nucleicos no modificados. Las bases incluyen purinas y pirimidinas, que además incluyen los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales. Los derivados sintéticos de purinas y pirimidinas incluyen, pero no se limitan a modificaciones que ponen nuevos grupos reactivos en el nucleótido, tales como, pero no limitado a aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y haluros de alquilo. El término base abarca cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN. Un polinucleótido puede contener ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos, nucleótidos sintéticos, o cualquier combinación adecuada. Los polinucleótidos se pueden polimerizar in vitro, pueden ser recombinantes, contener secuencias quiméricas o derivados de esos grupos. Un polinucleótido puede incluir un resto terminal en el extremo 5', el extremo 3', o tanto en el extremo 5' como el 3'. El resto terminal puede ser, pero no limitado a un resto desoxi-básico invertido, un resto desoxi-timidina invertido, un resto timidina, o modificación 3' con glicerilo.

Un polinucleótido de ARN interferente (ARNi) es una molécula capaz de inducir el ARN interferente por interacción con la maquinaria de la ruta del ARN interferente de células de mamífero, para degradar o inhibir la traducción de transcritos de ARN mensajero (ARNm) de un transgén de una forma específica de la secuencia. Dos polinucleótidos de ARNi principales son los ARN interferentes pequeños (o cortos) (ARNip) y los micro ARN (miARN). Los polinucleótidos de ARNi se pueden seleccionar del grupo que comprende: ARNip, microARN, ARN bicatenario (ARNbc), ARN horquillado corto (ARNhc), y casetes de expresión que codifican ARN capaz de inducir ARN interferente. El ARNip comprende una estructura bicatenaria que contiene típicamente 15-50 pares de bases y preferiblemente 21-25 pares de bases y que tiene una secuencia de nucleótidos idéntica (perfectamente complementaria) o casi idéntica (parcialmente complementaria) a una secuencia codificante en un gen diana expresado o ARN dentro de la célula. Un ARNip puede tener extremos protuberantes de dinucleótidos 3'. Un ARNip puede estar compuesto de dos polinucleótidos asociados o un solo polinucleótido que forma una estructura horquillada. Una molécula de ARNip de la invención contiene una región codificante y una región de sentido contrario. En una realización, el ARNip del conjugado se ensambla a partir de dos fragmentos de oligonucleótidos en donde un fragmento comprende la secuencia de nucleótidos de la cadena de sentido contrario de la molécula de ARNip y un segundo fragmento comprende la secuencia de nucleótidos de la región codificante de la molécula de ARNip. En otra realización, la cadena codificante está conectada a la cadena de sentido contrario por una molécula conectora, tal como un conector polinucleótido o un conector no nucleótido. Los microARN (miARN) son productos génicos de ARN no codificante pequeño de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que dirigen la destrucción o represión de la traducción de sus dianas ARNm. Si la complementariedad entre el miARN y el ARNm diana es parcial, se reprime la traducción del ARNm diana. Si la complementariedad es extensa, el ARNm diana se escinde. Para los miARN, el complejo se une a los sitios diana normalmente situados en las UTR 3' de los ARNm que típicamente comparten solo homología parcial con el miARN. Una "región semilla", un tramo de aproximadamente siete (7) nucleótidos consecutivos en el extremo 5' del miARN que forma emparejamiento de bases perfecto con su diana, tiene una función principal en la especificidad del miARN. La unión del complejo RISC/miARN al ARNm puede conducir a la represión de la traducción de proteína o a la escisión y degradación del ARNm. Datos recientes indican que la escisión del ARNm se produce con preferencia si hay una homología perfecta a lo largo de toda la longitud del miARN y su diana, en lugar de mostrar solo emparejamiento de bases perfecto en la región semilla (Pillai et al. 2007).

Los casetes de expresión del polinucleótido de ARNi se pueden transcribir en la célula para producir ARN horquillados pequeños que funcionan como ARNip, ARNip lineales de cadena codificante y de sentido contrario separados, o miARN. Los ADN transcritos por la ARN polimerasa III contienen promotores seleccionados de la lista que comprende: promotores U6, promotores H1, y promotores ARNt. Los promotores de la ARN polimerasa II incluyen promotores U1, U2, U4 y U5, promotores de ARNnp, promotores de microARN, y promotores de ARNm.

Se pueden encontrar listas de secuencias de miARN en bases de datos mantenidas por organizaciones de investigación tales como Wellcome Trust Sanger Institute, Penn Center for Bioinformatics, Memorial Sloan Kettering Cancer Center, y European Molecule Biology Laboratory, entre otras. Las secuencias de ARNip eficaces conocidas y los sitios de unión cognados también están bien representados en la bibliografía relevante. Las moléculas de ARNi son diseñadas y producidas fácilmente por tecnologías conocidas en la técnica. Además, hay herramientas computacionales que aumentan la posibilidad de encontrar motivos de secuencias eficaces y específicos (Pei et al. 2006, Reynolds et al. 2004, Khvorova et al. 2003, Schwarz et al. 2003, Ui-Tei et al. 2004, Heale et al. 2005, Chalk et al. 2004, Amarguoui et al. 2004).

Los polinucleótidos de la invención se pueden modificar químicamente. Los ejemplos no limitantes de modificaciones químicas incluyen: uniones internucleótidos fosforotioato, 2'-O-metil-ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro-ribonucleótidos, 2'-desoxi-ribonucleótidos, nucleótidos "bases universales", 5-C-metil-nucleótidos, e incorporación de restos desoxibásicos invertidos. Estas modificaciones químicas, cuando se usan en diferentes construcciones de polinucleótidos, han mostrado conservar la actividad del polinucleótido en células, mientras que al mismo tiempo aumentan la estabilidad en el suero de estos compuestos. Químicamente el ARNip modificado también puede minimizar la posibilidad de activar la actividad de interferones en seres humanos.

En una realización, un polinucleótido de ARNi químicamente modificado de la invención, comprende un dúplex que tiene dos cadenas, una de las cuales o ambas pueden estar químicamente modificadas, en donde cada cadena es

de aproximadamente 19 a aproximadamente 29 nucleótidos. En una realización, un polinucleótido de ARNi de la invención comprende uno o más nucleótidos modificados, a la vez que mantiene la capacidad de mediar el ARNi dentro de una célula o sistema in vitro reconstituido. Se puede modificar un polinucleótido de ARNi en donde la modificación química comprende uno o más (p. ej., aproximadamente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) de los nucleótidos. El polinucleótido de ARNi de la invención puede comprender nucleótidos modificados como un porcentaje del número total de nucleótidos presente en el polinucleótido de ARNi. Como tal, un polinucleótido de ARNi de la invención en general puede comprender los nucleótidos modificados de aproximadamente 5 a aproximadamente 100% de las posiciones de nucleótidos (p. ej., 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% de las posiciones de nucleótidos). El porcentaje real de nucleótidos modificados presentes en un polinucleótido de ARNi dado depende del número total de nucleótidos presentes en el polinucleótido de ARNi. Si el polinucleótido de ARNi es monocatenario, el porcentaje de modificación se puede basar en el número total de nucleótidos presentes en el polinucleótido de ARNi monocatenario. Igualmente, si el polinucleótido de ARNi es bicatenario, el porcentaje de modificación se puede basar en el número total de nucleótidos presentes en la cadena codificante, cadena de sentido contrario o tanto la cadena codificante como la de sentido contrario. Además, el porcentaje real de nucleótidos modificados presentes en un polinucleótido de ARNi dado puede depender también del número total de nucleótidos de purina y pirimidina presente en el polinucleótido de ARNi. Por ejemplo, en donde están modificados todos los nucleótidos de pirimidina y/o todos los nucleótidos de purina presentes en el polinucleótido de ARNi.

Un polinucleótido de ARNi modula la expresión del ARN codificado por un gen. Debido a que múltiples genes pueden compartir el mismo grado de homología de secuencia entre ellos, se puede diseñar un polinucleótido de ARNi para dirigirse a una clase de genes con suficiente homología de la secuencia. Por lo tanto, un polinucleótido de ARNi puede contener una secuencia que tiene complementariedad con secuencias que son compartidas entre diferentes genes diana o que son únicas para un gen diana específico. Por lo tanto, el polinucleótido de ARNi se puede diseñar para que se dirija a regiones conservadas diana de una secuencia de ARN que tiene homología entre varios genes, dirigiéndose así a varios genes en una familia de genes (p. ej., diferentes isoformas de genes, variantes de corte y empalme, genes mutantes, etc.). En otra realización, el polinucleótido de ARNi se puede diseñar para que se dirija a una secuencia que es única de una secuencia de ARN específica de un solo gen.

El término complementariedad se refiere a la capacidad de un polinucleótido para formar enlace(s) de hidrógeno con otra secuencia de polinucleótido por tipos tradicionales de Watson-Crick u otros no tradicionales. En relación con las moléculas de polinucleótidos de la presente invención, la energía libre de la unión para una molécula de polinucleótido con su diana (sitio de unión del efector) o secuencia complementaria, es suficiente para permitir que proceda la función relevante del polinucleótido, p. ej., escisión enzimática de ARNm o inhibición de la traducción. La determinación de las energías libres de unión para moléculas de ácido nucleico son bien conocidas en la técnica (Frier et al. 1986, Turner et al. 1987). Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de bases, en una cadena contigua, en una primera molécula de polinucleótido que pueden formar enlaces de hidrógeno (p. ej., emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de polinucleótidos (p. ej., 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 siendo 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, y 100% complementaria). Perfectamente complementaria significa que todas las bases en una cadena contigua de una secuencia de polinucleótido formarán enlace de hidrógeno con el mismo número de bases contiguas en una segunda secuencia de polinucleótido.

Por inhibición, regulación por disminución o inactivación de la expresión génica, se entiende que la expresión del gen, medida por el nivel de ARN transcrito del gen o el nivel de polipéptido, proteína o subunidad de proteína traducida del ARN, se reduce por debajo de la observada en ausencia de los conjugados de polinucleótidos bloqueantes de la invención. La inhibición, regulación por disminución o inactivación de la expresión génica, con un polinucleótido suministrado por las composiciones de la invención, es preferiblemente inferior al nivel observado en presencia de un ácido nucleico inactivo de control, un ácido nucleico con secuencia desordenada o con apareamientos erróneos inactivantes, o en ausencia de conjugación del polinucleótido al polímero enmascarado.

#### Administración in vivo

En farmacología y toxicología, una vía de administración es la ruta por la que un fármaco, fluido, veneno u otra sustancia se pone en contacto con el cuerpo. En general, los métodos de administración de fármacos y ácidos nucleicos para el tratamiento de un mamífero son bien conocidos en la técnica, y se pueden aplicar a la administración de las composiciones de la invención. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar por cualquier vía adecuada, lo más preferiblemente vía parenteral, en una preparación hecha adecuadamente para esta vía. Por lo tanto, los compuestos de la presente invención se pueden administrar por inyección, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, o intraperitoneal. Por consiguiente, la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las vías de administración parenteral incluyen las inyecciones intravascular (intravenosa, intraarterial), intramuscular, intraparénquima, intradérmica, subdérmica, subcutánea, intratumoral, intraperitoneal, intratecal, subdural, epidural, e intralinfática, que usan una jeringa y una aguja o catéter. Intravascular en la presente memoria significa dentro de una estructura tubular llamada un vaso que está conectado a un tejido u órgano dentro del cuerpo. Dentro de la cavidad de la estructura tubular, un fluido corporal fluye hacia o desde una parte del cuerpo.

Los ejemplos de fluidos corporales incluyen sangre, líquido cefalorraquídeo (LCR), líquido linfático o bilis. Los ejemplos de vasos incluyen arterias, arteriolas, capilares, vénulas, sinusoides, venas, vasos linfáticos, conductos biliares y conductos de las glándulas salivares u otras glándulas exocrinas. La ruta intravascular incluye el suministro a través de los vasos sanguíneos tales como una arteria o una vena. El sistema circulatorio de la sangre proporciona la extensión sistémica del producto farmacéutico.

Las composiciones descritas se inyectan en disoluciones vehículo farmacéuticamente aceptables. Farmacéuticamente aceptable se refiere a aquellas propiedades y/o sustancias que son aceptables para el mamífero desde el punto de vista farmacológico/toxicológico. La frase farmacéuticamente aceptable se refiere a entidades moleculares, composiciones y propiedades que son fisiológicamente tolerables y típicamente no producen una reacción alérgica u otra reacción adversa o tóxica cuando se administran a un mamífero. Preferiblemente, como se usa en la presente memoria, la expresión farmacéuticamente aceptable significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o nacional o citada en la Farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida, para usar en animales y más en particular en seres humanos.

El conjugado del polinucleótido de ARNi-resto director se coadministra con el polímero de suministro. Por coadministración se entiende que el polinucleótido de ARNi y el polímero de suministro se administran al mamífero de modo que están presentes ambos en el mamífero al mismo tiempo. El conjugado de polinucleótido de ARNi-resto director y el polímero de suministro se pueden administrar simultáneamente o se pueden suministrar de forma secuencial. Para la administración simultánea, se pueden mezclar antes de la administración. Para la administración secuencial, se puede administrar primero el conjugado de polinucleótido de ARNi-resto director o el polímero de suministro.

Para los conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director hidrófobo, el conjugado de ARNi se puede administrar hasta 30 min antes de la administración del polímero de suministro. También para los conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director hidrófobo, el polímero de suministro se puede administrar hasta dos horas antes de la administración del conjugado de ARNi.

Para los conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director de agrupación de galactosas, el conjugado de ARNi se puede administrar hasta 15 min antes de la administración del polímero de suministro. También para los conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director de agrupación de galactosas, el polímero de suministro se puede administrar hasta 15 min antes de la administración del conjugado de ARNi.

#### Efecto terapéutico

Los polinucleótidos de ARNi se pueden suministrar con fines de investigación o para producir un cambio en una célula, es decir terapéutico. El suministro in vivo de polinucleótidos de ARNi es útil para reactivos de investigación y para una variedad de aplicaciones terapéuticas, de diagnóstico, validación de objetivos, descubrimiento genómico, ingeniería genética y farmacogenómica. Los autores de la invención han descrito el suministro de polinucleótido de ARNi que produce la inhibición de la expresión de genes endógenos en hepatocitos. Los niveles de expresión de un gen indicador (marcador) medidos después del suministro de un polinucleótido, indican una expectativa razonable de niveles similares de expresión génica después de suministro de otros polinucleótidos. Los niveles de tratamiento considerados beneficiosos por un experto en la técnica, difieren de una enfermedad a otra. Por ejemplo, la hemofilia A y B son causadas por deficiencias en los factores de coagulación VIII y IX ligadas al cromosoma X, respectivamente. En su evolución clínica influye mucho el porcentaje de los niveles normales en el suero del factor VIII o IX: < 2%, grave; 2-5%, moderada; y 5-30% leve. Por lo tanto, un aumento de 1% a 2% del nivel normal del factor de coagulación en pacientes graves, se puede considerar beneficiosa. Niveles mayores que 6% previenen las hemorragias espontáneas pero no las secundarias a cirugía o lesión. Igualmente, la inhibición de un gen no es necesario que sea 100% para proporcionar un beneficio terapéutico. Un experto en la técnica de la terapia génica preferiría razonablemente los niveles beneficiosos de la expresión de un gen específico para una enfermedad, basándose en los niveles suficientes de los resultados del gen marcador. En la hemofilia de ejemplo, si los genes marcadores eran expresados para dar una proteína en un nivel comparable en volumen a 2% del nivel normal del factor VIII, se podría esperar razonablemente que el gen que codifica el factor VIII fuera expresado también en niveles similares. Por lo tanto, los genes indicadores o marcadores sirven como referencias útiles para la expresión de proteínas intracelulares en general.

El hígado es uno de los tejidos diana más importantes para la terapia génica, dada su función central en el metabolismo (p. ej., metabolismo de lipoproteínas en diferentes hipercolesterolemias) y la secreción de proteínas circulantes (p. ej., factores de coagulación en la hemofilia). Además, los trastornos adquiridos tales como la hepatitis crónica y la cirrosis son comunes y también son potencialmente tratadas mediante terapias en el hígado basadas en polinucleótidos. Una serie de enfermedades o afecciones que afectan o están afectadas por el hígado son tratadas potencialmente por inactivación (inhibición) de la expresión génica en el hígado. Dichas enfermedades y afecciones hepáticas se pueden seleccionar de la lista que comprende: cáncer de hígado (incluyendo carcinoma hepatocelular, HCC), infecciones víricas (incluyendo hepatitis), trastornos metabólicos, (incluyendo hiperlipidemia y diabetes), fibrosis, y lesión hepática aguda.

La cantidad (dosis) del polímero de suministro y el conjugado de polinucleótido de ARNi que se va a administrar se puede determinar empíricamente. Se ha mostrado inactivación eficaz de la expresión génica usando 0,1-10 mg/kg de peso animal de conjugado de ARNi y 5-60 mg/kg de peso animal de polímero de suministro. Una cantidad preferida en ratones es 0,25-2,5 mg/kg de conjugado de ARNi y 10-40 mg/kg de polímero de suministro. Más preferiblemente, se administran aproximadamente 12,5-20 mg/kg de polímero de suministro. La cantidad de conjugado de polinucleótido de ARNi se aumenta fácilmente porque típicamente no es tóxico en dosis mayores.

Como se usa en la presente memoria, in vivo significa que tiene lugar dentro de un organismo, y más específicamente un proceso realizado en o sobre el tejido vivo de un organismo multicelular vivo, completo (animal), tal como un mamífero, en oposición a una parte o uno muerto.

## 10 Ejemplos

Síntesis de polímero

Ejemplo 1. Copolímeros aleatorios de poli(éter vinílico).

A. Monómeros de éter vinílico para la incorporación de monómeros que contienen amina. La 2-viniloxietil-ftalimida se preparó haciendo reaccionar el éter de 2-cloroetilo y vinilo (25 g, 0,24 mol; n° CAS 110-75-8) y ftalimida potásica (25 g, 0,135 mol; n° CAS 1074-82-4) en *N,N*-dimetilformamida (DMF, 75 ml) a 100°C usando bromuro de tetra-*n*-butilamonio (0,5 g; n° CAS 1643-19-2) como el catalizador de transferencia de fase. Esta disolución se calentó durante 6 h y después se precipitó en agua y se filtró. Este sólido después se recristalizó dos veces en metanol para dar cristales blancos.

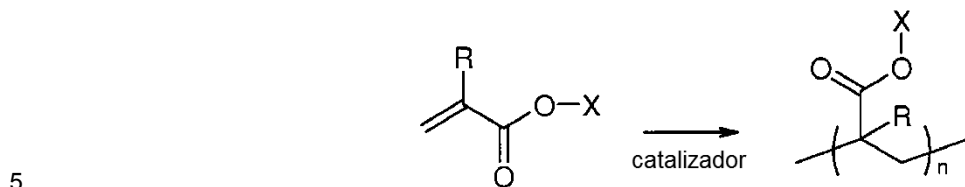
B. Síntesis de terpolímeros de poliamina de poli(éter vinílico) activos en la membrana, anfipáticos, solubles en agua. Se añaden X % en moles de éter vinílico con amina protegida (p. ej., 2-viniloxietil-ftalimida) a un matraz de fondo redondo secado en horno, bajo una capa de nitrógeno en diclorometano anhidro. A esta disolución se añaden Y % en moles de éter vinílico con grupo hidrófobo inferior (p. ej., propilo, butilo) y opcionalmente Z % en moles de éter vinílico con grupo hidrófobo superior (p. ej., dodecilo, octadecilo) (FIG. 1). Esta disolución se pone en un baño de -50 a -78°C, y se deja que precipita la 2-viniloxietil-ftalimida. A esta disolución se añaden 10% en moles de BF<sub>3</sub>·(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> y se deja que la reacción proceda durante 2-3 h de -50 a -78°C. La polimerización se termina por la adición de disolución de hidróxido amónico en metanol. El polímero se lleva a sequedad a presión reducida y después se pone en 1,4-dioxano/metanol (2/1). Se añaden 20 eq. molares de hidrazina por ftalimida para eliminar el grupo protector de la amina. La disolución se calienta a reflujo durante 3 h y después se lleva a sequedad a presión reducida. El sólido resultante se disuelve en HCl 0,5 mol/l y se calienta a reflujo durante 15 min para formar la sal de hidrocloreuro del polímero, se diluye con agua destilada, y se calienta a reflujo durante una hora adicional. La disolución después se neutraliza con NaOH, se enfría a temperatura ambiente (t.a.), se transfiere a un tubo diálisis de filtración molecular de celulosa, se dializa contra agua destilada y se liofiliza. El polímero se puede además purificar usando cromatografía de exclusión por tamaños u otra cromatografía. El peso molecular de los polímeros se calcula usando columnas de acuerdo con procedimientos convencionales, incluyendo cromatografía analítica de exclusión por tamaño molecular y cromatografía de exclusión por tamaño molecular con dispersión de luz multiángulos (SEC-MALS).

C. Síntesis de DW1360. Se sintetizó un terpolímero de poli(éter vinílico) con amina/butilo/octadecilo a partir de los monómeros 2-viniloxietil-ftalimida (5 g, 23,02 mmol), éter de butilo y vinilo (0,665 g, 6,58 mmol), y éter de octadecilo y vinilo (0,488 g, 1,64 mmol). Se añadió la 2-viniloxietil-ftalimida a un matraz de fondo redondo de 200 ml secado en horno, que contenía una barra agitadora magnética, bajo una capa de argón en 36 ml de diclorometano anhidro. A esta disolución se añadió éter de butilo y vinilo y éter de *n*-octadecilo y vinilo. Los monómeros se disolvieron completamente a temperatura ambiente (t.a.) para obtener una disolución homogénea transparente. Después, el recipiente de reacción que contenía la disolución transparente se puso en un baño a -50°C generado por adición de hielo seco a una disolución 1:1 de alcohol desnaturalizado de calidad ACS y etilenglicol, y se dejó que se formara un precipitado visible de monómero de ftalimida. Después de enfriar durante aproximadamente 1,5 min, se añadió BF<sub>3</sub>·(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0,058 g, 0,411 mmol) para iniciar la reacción de polimerización. El monómero de ftalimida se disolvió tras el inicio de la polimerización. La reacción se dejó avanzar durante 3 h a -50°C. La polimerización se detuvo por la adición de 5 ml de hidróxido amónico al 1% en metanol. Después los disolventes se separaron por evaporación rotatoria.

Después el polímero se disolvió en 30 ml de 1,4-dioxano/metanol (2/1). A esta disolución se añadió hidrazina (0,147 g, 46 mmol) y la mezcla se calentó a reflujo durante 3 h. Después los disolventes se separaron por evaporación rotatoria y el sólido resultante después se puso en 20 ml de HCl 0,5 mol/l y se calentó a reflujo durante 15 minutos, se diluyó con 20 ml de agua destilada, y se calentó a reflujo durante una hora adicional. Después esta disolución se neutralizó con NaOH, se enfrió a t.a., se transfirió a tubo de diálisis de celulosa con corte de peso molecular 3.500, se dializó durante 24 h (2x20 litros) frente a agua destilada y se liofilizó.

Aunque se describen polímeros que contienen los monómeros de éter vinílico indicados, la invención no se limita a estos monómeros particulares.

D. Síntesis de terpolímeros de poliacrilato de poliamina activos en la membrana, anfipáticos, solubles en agua. Los heteropolímeros de poliacrilato y polimetacrilato se pueden sintetizar usando el esquema de reacción de radicales libres general (como se usa en la presente memoria, un polimetacrilato-poliamina es un subgénero del género de poliacrilato-poliamina):



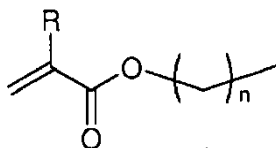
en donde **R** es independientemente un hidrógeno o grupo metilo y **X** representa los grupos colgantes de los monómeros deseados presentes en el polímero en las relaciones deseadas.

Para la síntesis de polímero, los monómeros adecuados incluyen, pero no se limitan a: monómeros que contienen amina protegida con BOC (**M**):



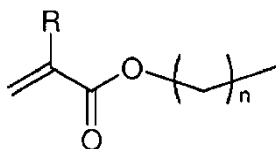
en donde  $n = 1-4$  y la eliminación del grupo protector BOC da una amina primaria.

Monómeros con grupo hidrófobo inferior (**N**):



en donde  $n = 1-5$  y uno o más carbonos pueden estar insaturados.

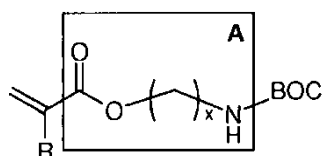
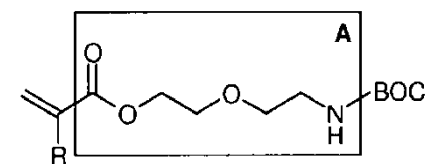
15 Monómeros con grupo hidrófobo superior (**O**):

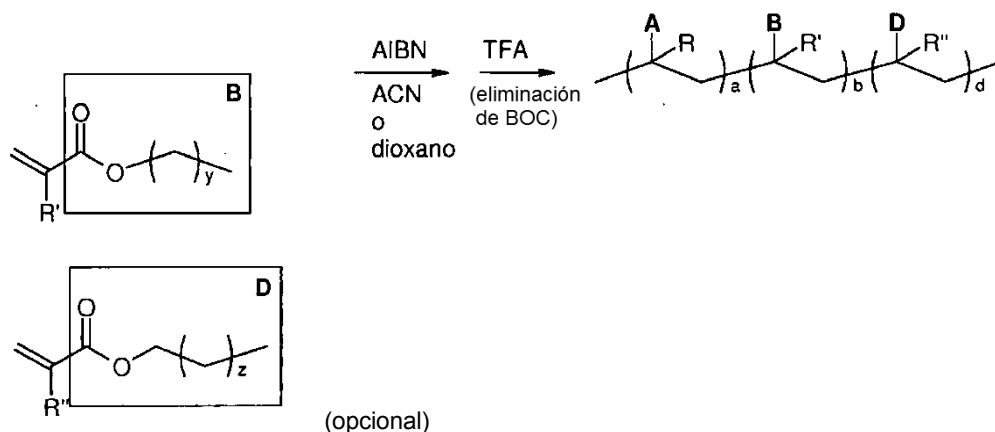


en donde  $n = 8-24$  y uno o más carbonos pueden estar insaturados.

Usando los monómeros anteriores, se pueden sintetizar heteropolímeros activos en la membrana con las siguientes composiciones: **M** puede ser 50-90% en moles; **N** puede ser 10-50 % en moles; **O** puede ser 0-10% en moles.

20 E. Síntesis de terpolímeros de poliacrilato-poliamina activos en la membrana, anfipáticos, solubles en agua.





R, R', y R'' son independientemente hidrógeno o metilo

x = 2, 3, o 4

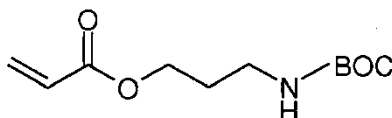
5 y = 0, 1, 2, 3, 4 o 5 [metilo (C1) - hexilo (C6)]

z = número entero  $\geq 8$  [decilo (C10) o mayor]

a, b, y d son números enteros seleccionados de modo que el polímero tenga la relación deseada de monómeros como se ha descrito antes.

10 Se añaden X % en moles de monómero de acrilato con amina protegida, Y % en moles de monómero de acrilato con grupo hidrófobo inferior, y opcionalmente Z % en moles de monómero de acrilato con grupo hidrófobo superior, a un tubo de reacción equipado con una barra agitadora. Se añade un disolvente adecuado (p. ej., acetonitrilo o dioxano), seguido de un catalizador adecuado (p. ej., AIBN), y la mezcla de reacción se purga con N<sub>2</sub>. Los tubos de reacción después se tapan y se transfieren a un baño de aceite y se calientan (p. ej., 60°C) durante un tiempo suficiente para permitir la polimerización (p. ej., 3 h). El polímero bruto se puede purificar por medios adecuados, incluyendo, pero no limitado a diálisis, cromatografía en columna y precipitación, antes de eliminar los grupos protectores BOC. Los grupos protectores BOC se eliminan por reacción con HCl 2 M en ácido acético glacial. La eliminación de los grupos protectores BOC da aminas primarias en polímero y un poli(acrilato)-poliamina activo en la membrana, soluble en agua. Después el polímero se puede purificar por medios adecuados, incluyendo diálisis, cromatografía en columna y precipitación.

20 Síntesis de (Ant 40911-3 23-28, Ant 40911-35-2). El 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo) (AIBN, iniciador de radicales), acetonitrilo, y dioxano se adquirieron en Sigma Aldrich. Los monómeros de acrilato y metacrilato se filtraron para separar los inhibidores. Se hizo reaccionar el 3-(BOC-amino)1-propanol (TCl) con cloruro de acrililoilo (CAS 814-68-6) para producir acrilato de BOC-amino-propilo (BAPA).

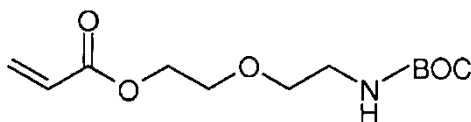


BAPA

25 En un matraz de fondo redondo de 2 litros, equipado con una barra agitadora, se disolvió 2-(2-aminoetoxi)etanol (21,1g, 202,9 mmol) en 350 ml de diclorometano. En un matraz de 1 litro separado, se disolvió anhídrido de BOC (36,6 g, 169,1 mmol) en 660 ml de diclorometano. El matraz de fondo redondo de 2 litros se equipó con un embudo de adición y se añadió la disolución de anhídrido de BOC al matraz a lo largo de 6 h. La reacción se dejó agitar durante la noche. En un embudo de separación, el producto se lavó con 300 ml de cada uno de ácido cítrico al 10%, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%, disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, y disolución saturada de NaCl. El producto, el 2-(2-aminoetoxi)etanol protegido con BOC, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se filtró por gravedad, y se evaporó el DCM usando evaporador rotatorio y alto vacío.

35 En un matraz de fondo redondo de 500 ml equipado con una barra agitadora y lavado por barrido con argón, se añadió 2-(2-aminoetoxi)etanol protegido con BOC (27,836 g, 135,8 mmol), seguido de 240 ml de diclorometano anhidro. Se añadió diisopropiletilamina (35,5 ml, 203,7 mmol) y el sistema se puso en un baño de hielo seco/acetona. Se diluyó cloruro de acrililoilo (12,1 ml, 149,4 mmol) usando 10 ml de diclorometano, y se añadió gota a gota al sistema barrido con argón. El sistema se mantuvo bajo argón y se dejó que llegara a temperatura ambiente y se agitó durante la noche. El producto se lavó con 100 ml de cada uno de dH<sub>2</sub>O, ácido cítrico al 10%, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al

10%, disolución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ , y disolución saturada de  $\text{NaCl}$ . El producto, el acrilato de BOC-aminoetiletoxi (BAEEA), se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtró por gravedad y el DCM se evaporó usando un evaporador rotatorio. El producto se purificó por cromatografía en columna en 29 cm de sílice usando una columna de 7,5 cm de diámetro. El sistema de disolventes usado era acetato de etilo al 30% en hexano. Rf: 0,30. Se recogieron las fracciones y el disolvente se separó usando un evaporador rotatorio y alto vacío. El BAEEA, se obtuvo con 74% de rendimiento. El BAEEA se almacenó en un congelador.



BAEEA

Polímero 40911-3 23-28: Relación de alimentación en moles 70% de BAPA, 25% de metacrilato de butilo (CAS 97-88-1), 5% de metacrilato de octadecilo (CAS 4813-57-4), (3% de catalizador AIBN) (moles totales 0,0139). Se añadieron BAPA (9,739 mmol) (**A**), metacrilato de butilo (3,478 mmol) (**B**), y metacrilato de octadecilo (0,6957 mmol) (**D**) a un tubo de reacción de 20 ml equipado con una barra agitadora. Se añadió acetonitrilo (16 ml) seguido de AIBN (0,4174 mmol). Se repitieron las etapas anteriores con el fin de tener dos reacciones ejecutadas en tándem. La mezcla de reacción se purgó con  $\text{N}_2$  durante 30 min. Después los tubos de reacción se taparon y se transfirieron a un baño de aceite y se calentaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 3 h. Después se retiraron los tubos y se combinaron los contenidos. El polímero bruto precipitó en agua desionizada, y se hizo reaccionar con ácido trifluoroacético solo (40 ml) durante 1,5 h para eliminar los grupos protectores BOC y producir aminas primarias y un poli(acrilato-poliamina activo en la membrana soluble en agua. Se añadieron 200 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) a la reacción, la disolución se transfirió a un tubo de diálisis de celulosa con corte de exclusión de PM 3500, se dializó frente a disolución salina alta durante 24 h, después frente a  $\text{dH}_2\text{O}$  durante 18 h. El contenido se evaporó hasta sequedad, se disolvió en 100 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$  y se liofilizó. El polímero seco se disolvió en disolución al 50% de MeOH/formiato amónico 100 mM/ácido fórmico al 0,2%, a concentración de 25 mg/ml. Se purificaron tres inyecciones de disolución de polímero bruto (250 mg, 10 ml) en medio S-200 Sephacryl usando una columna XK50/30 cm con un caudal de 5,0 ml/min. La columna se empaquetó y usó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. (GE Healthcare, instrucciones 56-1130-82 A1, 52-2086-00 AK). La elución del polímero se detectó usando un colector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. Se recogieron las fracciones de 23 min a 28 min y se combinaron para cada ejecución. Se evaporó el disolvente y el polímero purificado se liofilizó dos veces.

Polímero Ant 40911-35-2: Relación de alimentación en moles 80% de BAEEA, 15% de metacrilato de butilo, 5% de acrilato de octadecilo, (3% de catalizador AIBN) (moles totales 0,013913). Se añadieron BAEEA (**A**) (11,13 mmol), metacrilato de butilo (**B**) (2,086 mmol), y acrilato de octadecilo (**D**) (0,6957 mmol) a un tubo de reacción de 20 ml equipado con una barra agitadora. Se añadió dioxano (16 ml) seguido de AIBN (0,4174 mmol). Se repitieron las etapas anteriores con el fin de tener dos reacciones ejecutadas en tándem. La mezcla de reacción se purgó con  $\text{N}_2$  durante 30 min. Después los tubos de reacción se taparon y se transfirieron a un baño de aceite y se calentaron a  $60^\circ\text{C}$  durante 3 h. Después se retiraron los tubos y se combinaron los contenidos. Se evaporó el dioxano mediante evaporador rotatorio y alto vacío y el polímero bruto se disolvió en disolución de 89,8% de diclorometano/10% de tetrahidrofurano/0,2% de trietilamina a 70 mg/ml. Se purificaron tres inyecciones de disolución de polímero bruto (700 mg, 10 ml) en una columna de Jordi Gel de divinilbenceno de  $10^4$  Å (diámetro interno: 22 mm, longitud: 500 mm) usando con un caudal de 5,0 ml/min. La elución del polímero se detectó usando el colector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. Se recogieron las fracciones de 15,07 min-17,13 min y se combinaron. El disolvente se evaporó mediante evaporador rotatorio.

Se disolvieron aproximadamente 10 mg de polímero en 0,5 ml de 89,8% de diclorometano, 10% de tetrahidrofurano, 0,2% de trietilamina. El peso molecular y la polidispersidad (PDI) se midieron usando un detector de dispersión de luz multiángulos Wyatt Helos II conectado a un HPLC Shimadzu Prominence usando una columna Jordi de DVB de  $5 \mu$  7,8x300 Mixed Bed LS. Se obtuvo un peso molecular de 172.000 y una PDI de 1,26.

El polímero protegido con BOC purificado se hizo reaccionar con ácido trifluoroacético solo (7 ml) durante 1,5 h (o  $\text{HCl}$  2 M en ácido acético glacial durante 0,5 h) para eliminar los grupos protectores BOC y producir las aminas. Se añadieron 40 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$  a la reacción, la disolución se transfirió a un tubo de diálisis de celulosa con corte de exclusión de PM 3500, se dializó frente a disolución salina alta durante 24 h, después frente a  $\text{dH}_2\text{O}$  durante 18 h. El contenido se evaporó hasta sequedad, después se disolvió en 20-30 ml de  $\text{dH}_2\text{O}$  y se liofilizó dos veces. La disolución de polímero se almacenó a  $2-8^\circ\text{C}$ .

El número de átomos de carbono que unen la amina a la cadena principal del polímero y si el conector está o no ramificado, afecta al pKa de la amina y efectos estéricos cerca de la amina. Por ejemplo, para los polímeros anteriores, la etilamina tiene un pKa de aproximadamente 8,1, la propilamina tiene un pKa de aproximadamente 9,3, y la pentilamina tiene un pKa de aproximadamente 10,2. El pKa de la amina o efectos estéricos cerca de la amina, afectan a la labilidad de los grupos enmascaradores unidos a la amina. Para la unión reversible de un anhídrido maleico a una amina, un pKa mayor de la amina produce una velocidad más lenta de liberación de un anhídrido de



la amina. También el aumento del impedimento estérico cerca de la amina, tal como con un conector isopropilo, puede aumentar el pKa de la amina.

- 5 Polímero Lau 41305-38-17-19: Relación de alimentación en moles 80% de BAPA, 20% de metacrilato de metilo (CAS 97-63-2), (3% de catalizador AIBN) (moles totales 0,0105). Se añadieron BAPA (**A**) (8,40 mmol) y metacrilato de metilo (**B**) (2,10 mmol) a un tubo de reacción de 15 ml equipado con una barra agitadora. Se añadió acetonitrilo (11,5 ml) seguido de AIBN (0,315 mmol). Se repitieron las etapas anteriores con el fin de tener dos reacciones ejecutadas en tándem. La mezcla de reacción se purgó con N<sub>2</sub> durante 30 min. Después los tubos de reacción se taparon y se transfirieron a un baño de aceite y se calentaron a 60°C durante 3 h. Después se retiraron los tubos y se combinaron los contenidos. Se evaporó el acetonitrilo mediante evaporador rotatorio y alto vacío y el polímero bruto se disolvió en disolución de 74,8% de diclorometano/25% de tetrahidrofurano/0,2% de trietilamina hasta 50 mg/ml. Se purificaron tres inyecciones de disolución de polímero bruto (500 mg, 10 ml) en una columna de Jordi Gel de divinilbenceno fluorado de 10<sup>4</sup> Å (diámetro interno: 22 mm, longitud: 500 mm) usada con un caudal de 5,0 ml/min. La elución del polímero se detectó usando el colector de índice de refracción Shimadzu RID-10A. Se recogieron las fracciones de 17,16 min-19,18 min y se combinaron. El disolvente se evaporó por evaporación rotatoria. El polímero protegido con BOC purificado se hizo reaccionar con HCl 2 M en ácido acético glacial (7 ml) durante 1,5 h para eliminar los grupos protectores BOC y producir las aminas. Se añadieron 40 ml de dH<sub>2</sub>O a la reacción, la disolución se transfirió a un tubo de diálisis de celulosa con corte de exclusión de PM 3500, se dializó frente a disolución salina alta durante 24 h, después frente a dH<sub>2</sub>O durante 18 h. El contenido se evaporó hasta sequedad, después se disolvió en 30 ml de dH<sub>2</sub>O y se liofilizó dos veces.
- 10
- 15
- 20 F. Se prevé que polímeros similares, sintetizados a partir de monómeros de amina (protegida), monómeros con grupos hidrófobos inferiores, y grupos hidrófobo superiores octadecilo serán eficaces en la práctica de la invención descrita.

#### Caracterización de polímeros

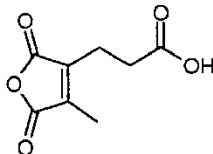
##### Ejemplo 2. Caracterización de DW1360.

- 25 A. Análisis anfipático. La fluorescencia del 1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno (DPH, Invitrogen) ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 452 \text{ nm}$ ) se potencia en un entorno hidrófobo. Este fluoróforo se usó para analizar el polímero DW1360. Se añadió DPH 0,5  $\mu\text{M}$  (concentración final) a 10  $\mu\text{g}$  de DW1360 en 0,5 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 8,0. Después se ensayó en la solución la acumulación de DPH en un entorno hidrófobo midiendo la fluorescencia del DPH. La mayor fluorescencia del DPH en presencia de los conjugados indica la formación de un entorno hidrófobo por el polímero.
- 30 B. Peso molecular. Los pesos (masas) moleculares PM de los polímeros se determinaron en un detector Wyatt Dawn Heleos II junto con optilab rEX en modo de lotes. Los polímeros se llevaron hasta diferentes concentraciones en disolvente adecuado y se cargó cada uno en el sistema Wyatt. Con el programa Astra después se calcularon los cambios en el índice de refracción en función de la concentración (dn/dc) que se usó en un gráfico de Zimm para calcular el PM. El peso molecular medio determinado para el DW1360 purificado era 4000-6000 Da. El peso molecular medio para los polímeros de acrilato purificados era aproximadamente 100-120 kDa.
- 35 C. Análisis de partículas y potencial zeta. El potencial zeta de los polímeros se midió usando un instrumento Series Malvern Zetasizer nano (Nano ZS). El potencial zeta de los polímeros enmascarados con CDM variaba entre 0 y -30 mV y de forma más predominante entre 0 y -20 mV. El potencial zeta se midió en glucosa isotónica tamponada a pH 8 con HEPES residual. A pH 7, se espera que los conjugados ganen alguna carga positiva debido a la protonación de algunas aminas.
- 40 D. Cuantificación de los grupos amina en conjugado después de modificación con reactivo CDMEl polímero DW1360 se sintetizó como se ha descrito previamente seguido de tratamiento con 14 equivalentes en peso de base HEPES y 7 equivalentes en peso de una mezcla 2:1 en p:p de CDM-NAG y CDM-PEG (media 11 unidades). Una hora más tarde, el contenido de amina del conjugado tratado con derivado de anhídrido maleico se midió por tratamiento con ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en NaHCO<sub>3</sub> 100 mM. Cuando se normalizó respecto a un conjugado que no se había modificado con maleamato, se determinó que la cantidad de aminas modificadas era aproximadamente 75% del total. Este grado de modificación se puede variar cambiando la cantidad de anhídrido maleico añadida o alterando las condiciones de reacción.
- 45 E. Lisis de liposomas. Se hidrataron 10 mg de fosfatidilcolina de huevo con 1 ml de tampón que contenía carboxifluoresceína 100 mM (CF) y HEPES 10 mM pH 7,5. Después los liposomas se extruyeron a través de filtros de policarbonato de poros de 100 nm (Nucleopore, Pleasanton, CA). La CF no atrapada se eliminó por cromatografía de exclusión por tamaño molecular usando Sepharose 4B-200 eluyendo con HEPES 10 mM a pH 8 y NaCl 0,1 mol/l. Se añadió una parte alícuota de 200  $\mu\text{l}$  de liposomas cargados con CF a 1,8 ml de tampón isotónico. Se midió la fluorescencia ( $\lambda_{\text{ex}}=488$ ,  $\lambda_{\text{em}}=540$ ) 30 min después de la adición de 0,25  $\mu\text{g}$  de polímeros a las suspensiones de vesículas. Al final de cada experimento, las vesículas se alteraron por la adición de 40  $\mu\text{l}$  de una disolución de Triton X-100 al 1% para determinar la lisis máxima.
- 50
- 55

#### Agentes de enmascaramiento del polímero

## Ejemplo 3. Agentes de enmascaramiento.

A. Síntesis del precursor del agente de enmascaramiento anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico (anhídrido carboxidimetilmaleico o CDM).

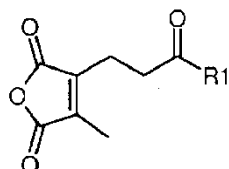


anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico

- 5 A una suspensión de hidruro sódico (0,58 g, 25 mmol) en 50 ml de tetrahidrofurano anhidro se añadió 2-fosfonopropionato de trietilo (7,1 g, 30 mmol). Después de parar la evolución de hidrógeno gaseoso, se añadió 2-oxoglutarato de dimetilo (3,5 g, 20 mmol) en 10 ml de tetrahidrofurano anhidro y se agitó durante 30 min. Después se añadieron 10 ml de agua, y el tetrahidrofurano se eliminó por evaporación rotatoria. La mezcla de sólido y agua resultante se extrajo con 3x50 ml de éter etílico. Las extracciones con éter se combinaron, se secaron con sulfato magnésico y se concentraron hasta un aceite amarillo claro. El aceite se purificó por cromatografía en gel de sílice, elución con éter:hexano 2:1 para dar 4 g (82% de rendimiento) del triéster puro. Después se formó el anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico disolviendo este triéster en 50 ml de una mezcla de agua y etanol 50/50 que contenía 4,5 g (5 equivalentes) de hidróxido potásico. Esta disolución se calentó a reflujo durante 1 h. Después se separó el etanol por evaporación rotatoria y la disolución se acidificó a pH 2 con ácido clorhídrico. Esta disolución acuosa después se extrajo con 200 ml de acetato de etilo, se aisló, se secó con sulfato magnésico y se concentró hasta un sólido blanco. Después este sólido se recristalizó en diclorometano y hexano para dar 2 g (80% de rendimiento) de anhídrido 2-propiónico-3-metilmaleico.

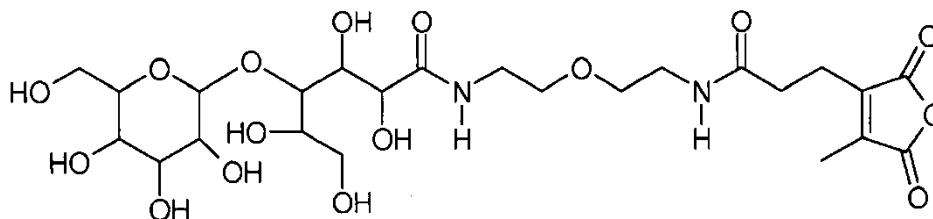
Se pueden sintetizar tioésteres, ésteres y amidas a partir del CDM por conversión del CDM en su cloruro de ácido con cloruro de oxalilo seguido de la adición de un tiol, éster o amina y piridina. El CDM y sus derivados se modifican fácilmente, por métodos convencionales en la técnica, con ligandos directores, estabilizantes estéricos, grupos cargados y otros grupos reactivos. Las moléculas resultantes se pueden usar para modificar aminas reversiblemente.

Los agentes de enmascaramiento se sintetizaron por modificación del CDM para producir preferiblemente agentes de carga neutra:



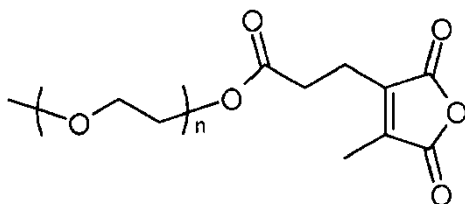
en donde R1 comprende un ligando que dirige al ASGPr o estabilizante estérico (p. ej. PEG).

B. Agente de enmascaramiento que contiene un grupo que dirige al ASGPr. Los ligandos que dirigen a hepatocitos más ampliamente estudiados se basan en galactosa, que se une por el receptor de asialoglicoproteína (ASGPr) en los hepatocitos. Se ha mostrado que la unión de galactosa o un derivado de galactosa facilitan el direccionamiento a los hepatocitos de algunos polímeros no cargados, muy solubles, que incluyen: el oligosacárido chitosán, un derivado de poliestireno y una poliacrilamida HPMA. Los grupos que dirigen al ASGPr se generan fácilmente usando lactosa, un disacárido de galactosa-glucosa, por modificación del resto de glucosa. El ácido lactobiónico (LBA), un derivado de lactosa en el que la glucosa se ha oxidado a ácido glucónico) se incorpora rápidamente a un derivado de anhídrido maleico usando técnicas de acoplamiento de amida convencionales.



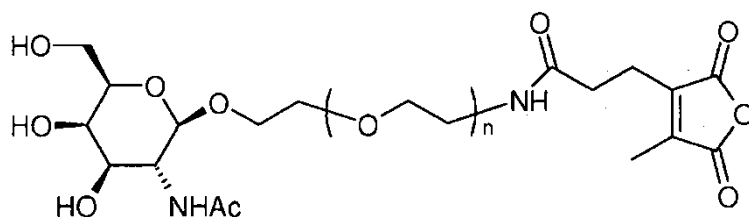
CDM-lactosa

5 C. Síntesis de estabilizante estérico CDM-PEG y grupo director CDM-NAG (N-acetil-galactosamina). A una solución de CDM (300 mg, 0,16 mmol) en 50 ml de cloruro de metileno, se añadió cloruro de oxalilo (2 g, 10 eq. en peso) y dimetilformamida (5  $\mu$ l). La reacción se dejó avanzar durante la noche, después de lo cual el exceso de cloruro de oxalilo y cloruro de metileno se eliminó con evaporador rotatorio para dar el cloruro de ácido CDM. El cloruro de ácido se disolvió en 1 ml de cloruro de metileno. A esta disolución se añadieron 1,1 equivalentes molares de éter monometílico del polietilenglicol (PM medio 550) para CDM-PEG o (aminoetoxi)etoxi-2-(acetilamino)-2-desoxi- $\beta$ -D-galactopiranosido (es decir, amino-bisetoxil-etil-NAG) para CDM-NAG, y piridina (200  $\mu$ l, 1,5 eq) en 10 ml de cloruro de metileno. La disolución después se agitó 1,5 h. Después se separó el disolvente y el sólido resultante se disolvió en 5 ml de agua y se purificó usando HPLC de fase inversa usando un gradiente de agua con TFA al 0,1%/acetonitrilo.



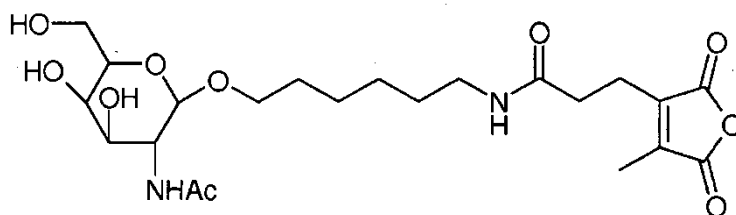
CDM-PEG

15 Preferiblemente, se use un PEG que contiene de 5 a 20 unidades de etileno al anhídrido maleico disustituido. Más preferiblemente, se use un PEG que contiene de 10-14 unidades de etileno al anhídrido maleico disustituido. El PEG puede ser de longitud variable y tener una longitud media de 5-20 o 10-14 unidades de etileno. Alternativamente, el PEG puede ser monodisperso, uniforme o discreto; teniendo, por ejemplo, exactamente 11 o 13 unidades de etileno.



CDM-NAG

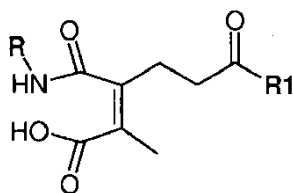
Como se ha mostrado antes, un espaciador de PEG se puede colocar entre el grupo anhídrido y el grupo que dirige al ASGPr. Un espaciador de PEG preferido contiene 1-10 unidades de etileno.



CDM-NAG con espaciador alquilo

## 20 Modificación de polímeros reversible

Ejemplo 4. Modificación/enmascaramiento reversible de la poliamina activa en la membrana; es decir, modificación del polímero activo en la membrana con CDM-NAG o una mezcla de CDM-NAG más CDM-PEG. A una disolución de  $x$  mg de poliamina activa en la membrana (p. ej., DW1360 descrito antes) en glucosa isotónica, se añadieron  $14x$  mg de base libre de HEPES seguido de  $7x$  mg de CDM-NAG o una mezcla de  $2,3x$  mg de CDM-NAG y  $4,6x$  mg de CDM-PEG, para un total de  $7x$  agente de enmascaramiento anhídrido maleico disustituido. Después la disolución se incubó durante al menos 30 min a t.a. antes de la administración animal. La reacción de CDM-NAG o CDM-PEG con la poliamina dio:



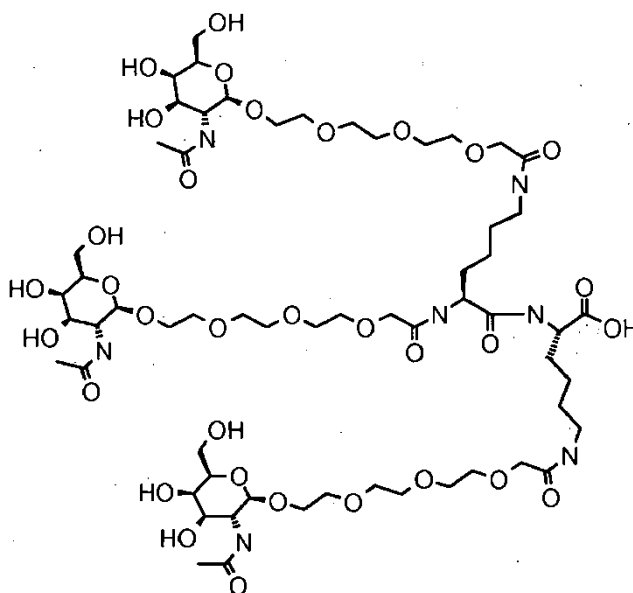
5 en donde R es el polímero y R1 comprende un resto que dirige a ASGPr o estabilizante estérico. El anhídrido-carboxilo producido en la reacción entre el anhídrido y la amina del polímero presenta  $\sim 1/20^a$  parte de la carga esperada (Rozema et al. *Bioconjugate Chemistry* 2003). Por lo tanto, el polímero activo en la membrana se neutraliza eficazmente en lugar de convertirse en un polianión con carga negativa alta.

Conjugado de siRNA

Ejemplo 5. Conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director

A. Conjugado de ARNi-grupo hidrófobo. Se unieron covalentemente diferentes grupos hidrófobos a los extremos 3' o 5' de moléculas de ARNi usando técnicas convencionales en la materia.

10 B. Conjugado de ARNi-agrupación de GalNAc. La agrupación de GalNAc se hizo por unión de tres grupos GalNAc-PEG<sub>3</sub> a las aminas en un punto de ramificación de dilisina. El grupo carboxilo en la dilisina está entonces disponible para la unión covalente al polinucleótido de ARNi, tal como un ARNiP.



Agrupación de GalNAc

Suministro in vivo de ARNiP

15 Ejemplo 6. Administración de polinucleótidos de ARNi in vivo y suministro a hepatocitos. Los conjugados del polinucleótido de ARNi y los polímeros enmascarados se sintetizaron como se ha descrito antes. Se obtuvieron ratones de 6 a 8 semanas de edad (cepa C57BL/6 o ICR,  $\sim 18-20$  g cada uno) de Harlan Sprague Dawley (Indianapolis IN). Los ratones se alojaron al menos 2 días antes de la inyección. La alimentación se realizó a voluntad con dieta para roedores Harlan Teklad (Harlan, Madison WI). Los conjugados del polinucleótido de ARNi y los polímeros enmascarados se sintetizaron como se ha descrito antes. Se inyectaron a los ratones 0,2 ml de disolución de polímero de suministro y 0,2 ml de conjugados de ARNiP en la vena de la cola. Para la inyección simultánea del polímero y el ARNiP, el conjugado de ARNiP se añadió al polímero modificado antes de la inyección, y se inyectó la cantidad entera de 0,4 ml. La composición era soluble y no se agregaba en condiciones fisiológicas. Para inyecciones en las que el polímero y el ARNiP se inyectan por separado, el polímero se inyectó en 0,2 ml de disolución de formulación y el ARNiP se inyectó en 0,2 ml de glucosa isotónica. Las disoluciones se inyectaron por infusión en la vena de la cola. La inyección en otros vasos, p. ej., inyección retroorbital, era igualmente eficaz.

*Determinación de los niveles de ApoB en el suero.* Los ratones se dejaron en ayunas durante 4 h (16 h para ratas) antes de recoger suero por sangrado submandibular. Los niveles de proteína ApoB en el suero se determinaron por métodos ELISA de tipo sándwich convencionales. Brevemente, se usó un anticuerpo policlonal de cabra anti-ApoB

de ratón y un anticuerpo de conejo anti-ApoB de ratón (Bioscience International) como anticuerpos de captura y detección, respectivamente. Después se aplicó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Sigma) para unirse al complejo de ApoB/anticuerpo. Después se midió la absorbancia del desarrollo colorimétrico de la tetrametil-benzidina (TMB, Sigma) por un lector de microplaca Tecan Safire2 (Austria, Europa) a 450 nm.

- 5 *Mediciones de la actividad del factor VII (F7) plasmático.* Las muestras de plasma de los ratones se prepararon recogiendo sangre (9 volúmenes) por sangrando submandibular, en tubos de microcentrífuga que contenían anticoagulante citrato sódico 0,109 mol/l (1 volumen) siguiendo procedimientos convencionales. La actividad del F7 en el plasma se midió con un método cromogénico usando un kit BIOPHEN VII (Hyphen BioMed/Aniara, Mason, OH) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La absorbancia del desarrollo colorimétrico se midió usando un lector de microplaca Tecan Safire2 a 405 nm.

Ejemplo 7. Suministro de ARNip a hepatocitos in vivo usando conjugados de ARNip-grupo hidrófobo coadministrados con polímero de suministro DW1360 enmascarado. El ARNip y el polímero de suministro se prepararon y administraron como se ha descrito antes usando las dosis indicadas de ARNip y polímero.

- 15 A. *Suministro de polinucleótido de ARNi a hepatocitos in vivo.* La coadministración del conjugado de ARNip-colesterol y polímero de suministro DW1360 enmascarado produjo menores niveles de proteína ApoB en el suero, indicando el suministro del ARNip a los hepatocitos y la inhibición de la expresión del gen apoB. El suministro eficaz requería tanto el polímero de suministro como la conjugación del colesterol con el polinucleótido de ARNi (tabla 1, FIG. 2). No se observó inactivación significativa con hasta 5 mg/kg de ARNip no conjugado. Además, el grupo hidrófobo se podía unir al extremo 5' o 3' del ARNip.

- 20 Tabla 1. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-grupo hidrófobo más polímero de suministro DW1360, efecto de la dosis de conjugado de ARNip.

ARNip	dosis de ARNip (mg/kg)	Dosis de polímero (mg/kg)	% relativo de ApoB <sup>a,b</sup>
5'-colesterol apoB	0,1	20	75 ±5
	0,25	20	42 ±3
	0,5	20	25 ±6
	1	20	26 ±17
3'-colesterol apoB	1	20	25 ±2
	5	0	102 ±33
ARNip no conjugado	0,5	16	87 ±4
	5	16	71 ±20

<sup>a</sup>Porcentaje de inactivación con respecto al grupo de control (n=3) inyectado con disolución de glucosa isotónica.

<sup>b</sup>ratones ICR

- 25 B. Efecto del tamaño del grupo hidrófobo en el suministro del polinucleótido de ARNi a hepatocitos. El suministro eficaz del ARNip a hepatocitos usando la coadministración con el polímero de suministro DW1360 requería que el ARNip se conjugara con un grupo hidrófobo que tuviera aproximadamente 20 o más átomos de carbono (Tabla 2, FIG. 3). Los conjugados de ARNip-grupo hidrófobo que tenían restos directores hidrófobos con menos de 20 átomos de carbono presentaban progresivamente menos suministro funcional eficaz. Los restos directores hidrófobos que tenían seis (6) o menos carbonos eran ineficaces. La eficacia del suministro no mejoró significativamente aumentando el tamaño del resto director hidrófobo más allá de 20 átomos de carbono.

Tabla 2. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-grupo hidrófobo más polímero de suministro DW1360, efecto del tamaño del grupo hidrófobo.

ARNip	Átomos de carbono <sup>b</sup>	dosis de ARNip (mg/kg)	Dosis de polímero (mg/kg)	% relativo de Factor VII <sup>a,c</sup>
5'-hexilo VII	6	2,5	12,5	108 ±18
5'-dodecilo fVII	12	2,5	12,5	66 ±18
5'-octadecilo fVII	18	2,5	12,5	61 ±19
5'-(decilo) <sub>2</sub> fVII	20	2,5	12,5	31 ±8
5'-(dodecilo) <sub>2</sub> fVII	24	2,5	12,5	15 ±5
5'-colesterol fVII	27	2,5	12,5	15 ±3
5'-(octadecilo) <sub>2</sub> fVII	36	2,5	12,5	16 ±3

<sup>a</sup>Porcentaje de inactivación con respecto al grupo de control (n=3) inyectado con disolución de glucosa isotónica.

<sup>b</sup> número de átomos de carbono en el grupo hidrófobo conjugado con el ARNip

5 <sup>c</sup> ratones C57BL/6

C. Efecto de la dosis de ARNip en el suministro de conjugados de ARNip-grupo hidrófobo a hepatocitos. La inactivación de la expresión del gen diana in vivo depende de la dosis de ARNip. Para el tratamiento de ratones, la administración de dosis de ARNip de más 1,25 mg/kg no mejoró la inactivación del gen diana in vivo (Tabla 3, FIG. 4). Sin embargo, una dosis tan baja como 0,25 mg/kg proporcionó inactivación significativa de la expresión del gen diana en ratones cuando se coadministró con el polímero de suministro.

10

Tabla 3. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-grupo hidrófobo más polímero de suministro DW1360, efecto de la dosis de ARNip.

ARNip	dosis de ARNip (mg/kg)	Dosis de polímero (mg/kg)	% relativo de Factor VII <sup>a,b</sup>
5'-(dodecilo) <sub>2</sub> fVII	2,5	12,5	15 ±5
	1,25	12,5	25 ±6
	0,5	12,5	44 ±14
	0,25	12,5	61 ±8
5'-(octadecilo) <sub>2</sub> fVII	2,5	12,5	16 ±3
	1,25	12,5	12 ±9
	0,5	12,5	23 ±10
	0,25	12,5	25 ±3
5'-colesterol fVII	2,5	12,5	15 ±3
	1,25	12,5	9 ±1
	0,5	12,5	31 ±8
	0,25	12,5	28 ±11

<sup>a</sup>Porcentaje de inactivación con respecto al grupo de control (n=3) inyectado con disolución de glucosa isotónica.

<sup>b</sup> ratones C57BL/6

15 D. La inactivación de la expresión del gen diana in vivo depende de la dosis de polímero de suministro. Para el tratamiento de ratones, la administración de aproximadamente 12,5 mg/kg de polímero de suministro proporcionó el suministro de polinucleótido de ARNi máximo o casi máximo, puesto de manifiesto por la inactivación del gen diana

(Tabla 4, FIG. 5). A la inactivación del gen diana le afecta la dosis de polímero. El exceso de conjugado de ARNip no mejoró la inactivación del gen diana en ausencia de suficiente polímero de suministro.

Tabla 4. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-grupo hidrófobo más polímero de suministro DW1360, efecto de la dosis de polímero de suministro.

ARNip	dosis de ARNip (mg/kg)	Dosis de polímero (mg/kg)	% relativo de ApoB <sup>a</sup>
3'-colesterol apoB	1	5	112 ±11 <sup>b</sup>
	1	8,75	54 ±20 <sup>b</sup>
	1	12,5	27 ±5 <sup>d</sup>
	1	17,5	28 ±14 <sup>b</sup>
	1	25	12 ±4 <sup>b</sup>
	1	3,75	91 ±21 <sup>c</sup>
	1	7	59 ±30 <sup>c</sup>
	1	12,5	38 ±19 <sup>c</sup>
	10	3,75	74 ±13 <sup>c</sup>
	10	7	71 ±24 <sup>c</sup>

5 <sup>a</sup>Porcentaje de inactivación con respecto al grupo de control (n=3) inyectado con disolución de glucosa isotónica.

<sup>b</sup> ratones ICR

<sup>c</sup> ratones C57BL/6

10 E. Administración secuencial. El conjugado de polinucleótido de ARNi-resto director hidrófobo y el polímero de suministro se administraron al animal de forma secuencial. Para los conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director hidrófobo, el conjugado de ARNi se puede administrar hasta 30 min antes de la administración del polímero de suministro. También para los conjugados de polinucleótido de ARNi-resto director hidrófobo, el polímero de suministro se puede administrar hasta dos horas antes de la administración del conjugado de ARNi (Tabla 5).

Tabla 5. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección de conjugado de ARNip-grupo hidrófobo más polímero de suministro DW1360, efecto de la administración secuencial del ARNip y el polímero.

ARNip	Primera inyección	Intervalo	Segunda inyección	% relativo de ApoB <sup>a</sup>
5'-colesterol apoB	ARNip 0,5 mg/kg	15 min	polímero 12,5 mg/kg	25 ±5
		30 min		35 ±13
		120 min		90 ±20
	polímero 12,5 mg/kg	120 min	ARNip 0,5 mg/kg	20 ±5
3'-colesterol apoB	ARNip 0,5 mg/kg	0 min	polímero 12,5 mg/kg	27 ±11
		15 min		25 ±9
		30 min		34 ±12
	polímero 12,5 mg/kg	15 min	ARNip 0,5 mg/kg	41 ±6
		30 min		41 ±15

15 <sup>a</sup>Porcentaje de proteína con respecto al grupo de control (n=3) inyectado con disolución de glucosa isotónica.

20 F. Polímero de suministro de poliácridato activos en la membrana. Las poliácridato-poliaminas activas en membrana, anfipáticas, enmascaradas reversiblemente, funcionan como polímeros de suministro eficaces. Los polímeros de poliácridato se prepararon como se ha descrito antes y se coadministraron con conjugados de ARNip-colesterol a ratones como se ha descrito para los polímeros de suministro DW1360. Los polímeros de suministro de poliácridato eran eficaces para facilitar el suministro de ARNip a hepatocitos in vivo, como indica la disminución de ApoB en el

suero (Tabla 6). El suministro eficaz requería tanto el polímero de suministro como la conjugación del colesterol con el polinucleótido de ARNi.

Tabla 6. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-grupo hidrófobo más polímeros de suministro de poliacrilato enmascarados.

Polímero de poliacrilato	ARNip	dosis de ARNip (mg/kg)	Dosis de polímero (mg/kg)	% relativo de ApoB
Ant 40911-3 23-38	5'-colesterol apoB	0,5	15	14 ±4
Ant 40911-35-2	5'-colesterol apoB	0,5	20	23±10

5

G. El suministro del conjugado de polinucleótido de ARNip-grupo hidrófobo en el hígado no dependía del receptor de LDL o de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína. La coadministración del conjugado de ARNip para factor VII-colesterol y el polímero de suministro DW1360 enmascarado produjo disminución en el suero de los niveles de proteína factor VII en ratones con inactivación génica del receptor LDL y ratones con inactivación génica doble de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína/receptor de LDL. Por lo tanto, el ARNip-colesterol se dirige a los hepatocitos mediante otros distintos de las partículas LDL, receptor de LDL o proteína relacionada con el receptor de lipoproteína (tabla 7).

10

Tabla 7. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-colesterol más polímero de suministro DW1360; efecto del receptor de LDL y proteína relacionada con el receptor de lipoproteína en el suministro de ARNip

15

ARNip	Dosis de ARNip (µg)	Dosis de polímero <sup>a</sup> (µg)	Modificación del polímero	% relativo de Factor VII <sup>a</sup>
<i>Ratones con inactivación génica del receptor de LDL</i>				
colesterol-ARNip para Factor VII	0	0		100 ±18
	20	400	NAG + PEG	35 ±18
	20	400	NAG	26 ±7
	20	400	PEG	99 ±9
<i>Ratones con inactivación génica doble de la proteína relacionada con el receptor de lipoproteína / receptor de LDL</i>				
colesterol-ARNip para Factor VII	0	0		100 ±20
	20	400	NAG + PEG	11 ±4
	20	400	NAG	26 ±9
	20	400	PEG	88 ±26

<sup>a</sup> % relativo de proteína

H. Muestras de poli(éter vinílico) liofilizadas. Para ensayar si el polímero de suministro se podía liofilizar para mejorar el almacenamiento y transporte, el polímero de suministro en disolución se congeló y se puso con alto vacío en un liofilizador. Después de 16 h, la muestra era un polvo cristalino que después se volvió a disolver por adición de agua desionizada. A la muestra de polímero redisoluto se le añadió ARNip (5'-colesterol apoB), y se inyectó la muestra. La liofilización no mostró efectos perjudiciales en el polímero de suministro.

20

ARNip dirigido por agrupación de galactosas

Ejemplo 8. Suministro de ARNip a hepatocitos in vivo usando conjugados de ARNip-agrupación de galactosas coadministrados con polímero de suministro DW1360 enmascarado. El ARNip y el polímero de suministro se prepararon y administraron como se ha descrito antes usando las dosis indicadas de ARNip y polímero.

25

A. Coadministración de conjugado de ARNip-agrupación de galactosas y polímero de suministro DW1360 enmascarado. La coadministración del conjugado de ARNip-agrupación de galactosas y polímero de suministro DW1360 enmascarado produjo menores niveles de proteína ApoB en el suero, indicando el suministro del ARNip a los hepatocitos y la inhibición de la expresión del gen apoB. El suministro eficaz requería tanto el polímero de suministro como la conjugación de la agrupación de galactosas con el polinucleótido de ARNi (tabla 8). No se

30



observó inactivación significativa con hasta 5 mg/kg de ARNip no conjugado. Como con el conjugado hidrófobo de ARNip anterior, el inicio de la inhibición máxima se obtiene con una dosis de polímero de suministro de aproximadamente 12,5 mg/kg. No se observó inactivación del gen diana en ausencia de polímero de suministro coadministrado. El conjugado de agrupación de galactosas-ARNip no presentó actividad por sí mismo.

5 Tabla 8. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-agrupación de galactosas más polímero de suministro, efecto de la dosis de polímero.

ARNip	dosis de ARNip <sup>a</sup> (mg/kg)	Dosis de polímero <sup>a</sup> (mg/kg)	% relativo de ApoB <sup>b</sup>
5'-agrupación de GalNAc apoB	0,5	10	48 ±9
	0,5	20	26 ±12
	0,5	40	15 ±6
	0,5	60	18 ±10
ARNip no conjugado	0,5	16	87 ±4

<sup>a</sup> mg de ARNip o polímero por kilogramo de peso animal

<sup>b</sup> % relativo de proteína

10 B. ARNip-agrupación de galactosas frente a ARNi-monómero de galactosa. El suministro funcional del ARNip a hepatocitos in vivo cuando se coadministraba con polímero de suministro, requería un resto director de galactosa triantenaria conjugado con el polinucleótido de ARN interferente. No se observó inactivación del gen diana cuando se conjugó una sola molécula de galactosa al ARNip (tabla 9). Se sabe que el derivado de galactosa GalNPr (N-propionil-galactosamina) tiene una afinidad mayor por el ASGPr que el derivado de galactosa GalNAc (N-acetilgalactosamina), indicando además la necesidad de la agrupación de galactosas triantenaria para el suministro eficaz.

15 Tabla 9. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-agrupación de GalNAc más polímero de suministro; conjugado de ARN y galactosa trivalente frente a monovalente.

ARNip	Ligando	dosis de ARNip <sup>a</sup> (mg/kg)	Dosis de polímero <sup>a</sup> (mg/kg)	% relativo de dosis <sup>b</sup>
apoB	5'-GalNPr monómero <sup>c</sup>	0,25	12,5	100 ±7
	5'-agrupación de GalNAc <sup>d</sup>	0,25	12,5	56 ±11

<sup>a</sup> mg de ARNip o polímero por kilogramo de peso animal

<sup>b</sup> % relativo de proteína

20 <sup>c</sup> monómero de N-Propionil-galactosamina

<sup>d</sup> Agrupación de N-Acetil-Galactosamina (trímero)

25 C. Efecto de la modificación del polímero con derivado de galactosa, PEG o derivado de galactosa más PEG. El ARNip-agrupación de galactosas y el polímero de suministro se prepararon como se ha descrito antes, excepto en lo siguiente: el polímero de suministro se enmascaró con N-acetilgalactosamina solo, PEG solo, o N-acetilgalactosamina más PEG. Después se administraron el ARNip y el polímero de suministro a ratones como se ha descrito antes. Después se recogieron muestras de sangre de ratones y se analizaron para determinar los niveles de ApoB. Tanto la galactosa como el PEG eran necesarios para el suministro óptimo. Al modificar el polímero activo en la membrana tanto con galactosa como con PET, solo era necesaria la mitad de la dosis de ARNip para lograr el mismo efecto que el polímero modificado solo con galactosa. La modificación del polímero con PEG solo produjo la

30 disminución del suministro de ARNip comparado con el polímero modificado con galactosa solo o con galactosa más PEG.

Tabla 10. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-agrupación de GalNAc más polímero de suministro; efecto de la modificación del polímero.

ARNip	dosis de ARNip <sup>a</sup> (mg/kg)	Dosis de polímero <sup>a</sup> (mg/kg)	Modificación del polímero	% relativo de ApoB <sup>b</sup>
5'-agrupación de GalNAc apoB	0,5	20	CDM-NAG + CDM-PEG	26 ±12
	1	20	CDM-NAG	23 ±10
	1	20	CDM-PEG	45 ±10

<sup>a</sup>mg de ARNip o polímero por kilogramo de peso animal

<sup>b</sup>% relativo de proteína

- 5 D. Evolución de la inactivación génica específica de secuencia después de coadministración de conjugado de ARNip-resto director y polímero de suministro. El ARNip y el polímero de suministro se prepararon y administraron a ratones como se ha descrito antes. Después se recogieron muestras de sangre de los ratones en los tiempos indicados y se analizaron para determinar los niveles de ApoB. Se observó que los niveles de ApoB disminuían gradualmente hasta que alcanzaban 3% del nivel de control después de 72 h. Por lo tanto, la inactivación máxima del gen diana se puede producir después de aproximadamente tres días (3). Este retraso en el inicio de la disminución máxima en niveles de proteínas puede reflejar el tiempo necesario para limpiar o degradar la proteína ApoB en lugar del tiempo necesario para el suministro máximo del polinucleótido de ARNi o para la inactivación génica.

15 Tabla 11. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-agrupación de GalNAc más polímero de suministro; evolución de la inactivación del gen diana.

ARNip	dosis de ARNip <sup>a</sup> (mg/kg)	Dosis de polímero <sup>a</sup> (mg/kg)	Horas después de inyección	% relativo de proteína <sup>b</sup>
5'-agrupación de GalNAc apoB	1	20	5	134 ±15
			24	35 ±3
			48	12 ±2
			72	3 ±1

<sup>a</sup>mg de ARNip o polímero por kilogramo de peso animal

<sup>b</sup>% relativo de proteína

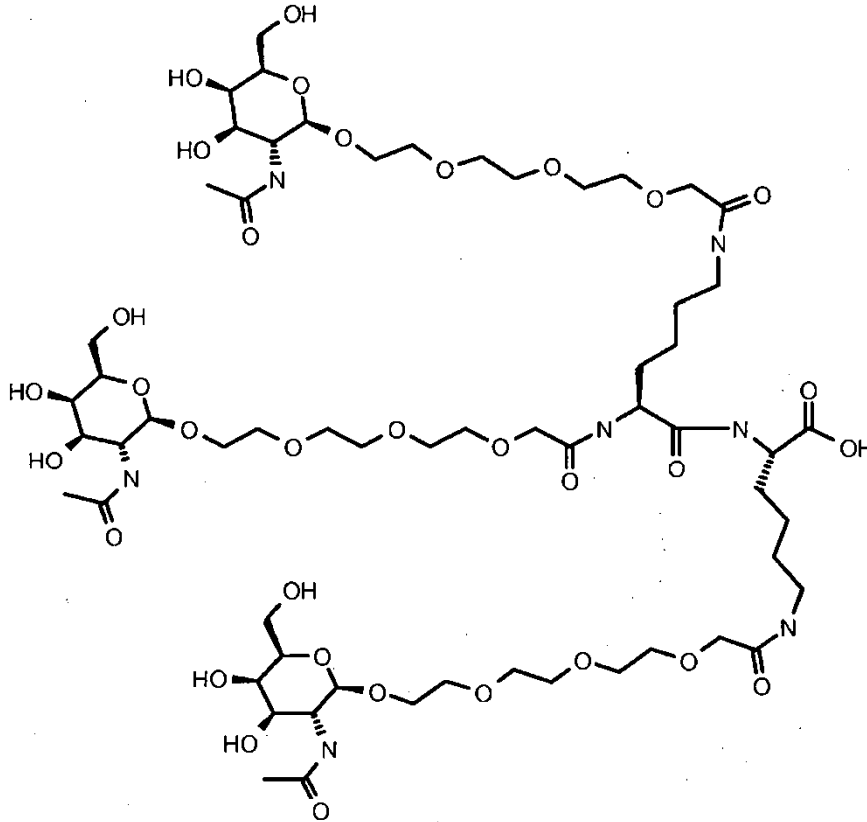
- 20 E. Inyección secuencial del conjugado de ARNip-agrupación de galactosas y polímero de suministro. Las cantidades indicadas de conjugado de ARNip-agrupaciones de galactosa y el polímero de suministro se prepararon y administraron a los ratones como se ha descrito antes. Después se recogieron muestras de sangre de ratones y se analizaron para determinar los niveles de ApoB. Para el ARNip dirigido al hígado con la agrupación de galactosas, se observó suministro óptimo con el suministro simultáneo del ARNip y el polímero de suministro. Se observó un suministro significativo de ARNip cuando el conjugado de ARNip se administró hasta 15 minutos después de administrar el polímero. Solo se observó un suministro modesto cuando el conjugado de ARNip se administró antes (hasta 15 min) del polímero de suministro.

25 Tabla 12. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-agrupación de GalNAc más polímero de suministro; administración simultánea y administración separada.

ARNip	Primera inyección	Intervalo	Segunda inyección	% relativo de ApoB
5'-agrupación de GalNAc apoB	ARNip 0,25 mg/kg	0 min	polímero 12,5 mg/kg	28 ±14
	polímero 12,5 mg/kg	15 min	ARNip 0,25 mg/kg	56 ±18
	ARNip 0,25 mg/kg	15 min	polímero 12,5 mg/kg	88 ±14

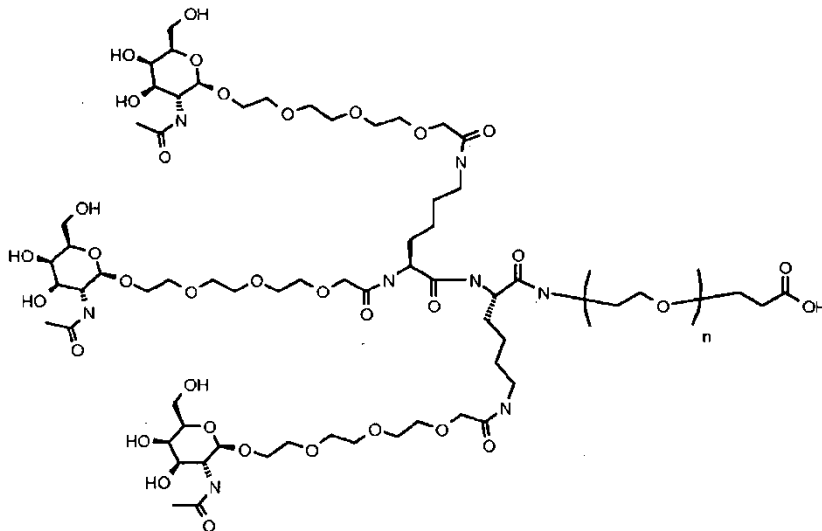
- 30 F. Inserción de un conector de PEG entre el ligando director de agrupación de galactosas y el polinucleótido de ARNi. Los conjugados de ARNip-agrupación de galactosa se prepararon insertando espaciadores PEG, PEG<sub>19</sub> o

PEG<sub>24</sub> entre la agrupación de galactosas y el ARNip, o se prepararon sin espaciador de PEG entre la agrupación de galactosas y el ARNip. Después los conjugados de ARNip se coadministraron con polímero de suministro. La inserción de espaciadores de PEG no mejoró el suministro del ARNip a los hepatocitos, determinado por la inactivación génica.



Agrupación de galactosas sin espaciador PEG; ligando director unido al ARNip por el grupo carboxilo

5



Agrupación de galactosas con espaciador PEG; ligando director unido al ARNip por el grupo carboxilo.

Agrupación de galactosas con espaciador de PEG; ligando director unido al ARNip por el grupo carboxilo.

Tabla 13. Inactivación del gen diana in vivo después de inyección del conjugado de ARNip-agrupación de GalNAc más polímero de suministro; efecto del conector PEG en el conjugado de ARN.

ARNip	dosis de ARNip <sup>a</sup> (mg/kg)	conector PEG	Dosis de polímero <sup>a</sup> (mg/kg)	% relativo de ApoB <sup>b</sup>
5'-agrupación de GalNAc apoB	0,25	ninguno	12,5	28 ±14
5'- agrupación de GalNAc- PEG <sub>19</sub> apoB	0,25	PEG19	12,5	82 ±19
5'-agrupación de GalNAc-PEG <sub>24</sub> apoB	0,25	PEG24	12,5	72 ±13

<sup>a</sup>mg de ARNip o polímero por kilogramo de peso animal

5 b% relativo de proteína

Ejemplo 9. Suministro de ARNip a hepatocitos de primate in vivo. Los conjugados de polinucleótido de ARNi y los polímeros enmascarados se sintetizaron como se ha descrito antes.

10 Se inyectó a macaco Rhesus (macho de 3,9 kg) vía i.v. 7,8 ml de una disolución que contiene colesterol-siApoB 1,0 mg/ml y DW1360 7,5 mg/ml modificado con 7x CDM-PEG:CDM-NAG relación en peso 2:1, dando una dosis final de colesterol-siApoB de 2 mg/kg y DW1360 15 mg/kg. Se inyectó a otro mono Rhesus (macho de 4,5 kg) glucosa isotónica y sirvió como un control.

15 *Determinación de los niveles de ApoB en el suero.* Se vigilaron los niveles de proteína ApoB en el suero durante la evolución. Los primates estuvieron en ayunas 4 h antes de recoger el suero. Los niveles de proteína ApoB en el suero se determinaron por métodos ELISA de tipo sándwich convencionales. Brevemente, se usó un anticuerpo policlonal de cabra anti-ApoB de ratón y un anticuerpo de conejo anti-ApoB de ratón (Bioscience International) como anticuerpos de captura y detección, respectivamente. Después se aplicó un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con HRP (Sigma) para unirse al complejo de ApoB/anticuerpo. Después se midió la absorbancia del desarrollo colorimétrico de la tetrametil-benzidina (TMB, Sigma) mediante un lector de microplaca Tecan Safire2 (Austria, Europa) a 450 nm. Los resultados se dan en la tabla 14. El mono Rhesus que recibió el colesterol-ipApoB ARNip mostró una disminución de los niveles de ApoB en el suero a lo largo del tiempo, alcanzando una inactivación máxima de 76% el día 15 después de inyección, comparado con los niveles del día -1 antes de de la dosis. Los niveles de ApoB se recuperaron hasta cerca de los niveles del día -1 antes de la dosis, el día 50. No se observó disminución de los niveles de ApoB en el suero en el animal de control.

Tabla 14. Niveles de ApoB en el suero normalizados respecto al día 1.

Día	Tratamiento	
	Glucosa isotónica	col-ARNip (ApoB) + polímero
1	1,00	1
2	1,24	1,07
4	1,38	0,69
7	1,22	0,56
11	1,39	0,32
15	1,43	0,24
18	1,36	0,25
22	1,44	0,31
29	1,13	0,30
36	1,21	0,48

25

Ejemplo 10. Inactivación simultánea de dos genes. La coadministración de conjugados de ARNip-colesterol a dos genes independientes, apoB y factor VII, y el polímero de suministro DW1360 enmascarado produjo la inhibición simultánea de ambos genes. La composición se administró a ratones como se ha descrito antes. (Tabla 15).

5 Tabla 15. Inactivación simultánea de 2 genes diana in vivo después de inyección de dos conjugados de ARNip-grupo hidrófobo diferentes más 400 µg de polímero de suministro DW1360.

3'-colesterol-apoB (µg)	3'-colesterol- factor VII (µg)	% relativo de ApoB <sup>a</sup>	% relativo de Factor VII <sup>a</sup>
0	0	100 ±19	100 ±25
20	0	12 ±4	124 ±21
0	20	81 ±12	14 ±5
20	20	10 ±6	12 ±1

<sup>a</sup>Porcentaje de inactivación con respecto al grupo de control (n=3) inyectado con disolución de glucosa isotónica.

#### Evaluación de la toxicidad

10 Ejemplo 11. Toxicidad. La potencial toxicidad del sistema de suministro se evaluó midiendo los niveles en el suero de enzimas hepáticas y citoquinas. Se detectaron ligeras elevaciones de los niveles de ALT y AST en ratones que recibían ARNip de control o conjugados de ARNip para apoB-1, comparado con los ratones tratados con disolución salina 48 h después de inyección. Sin embargo, los niveles mayores no eran significativos ( $p < 0,05$ ) y el examen histológico de secciones de hígado no puso de manifiesto signos de toxicidad hepática. De forma similar, el análisis de los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-6 en el suero usando ELISA, puso de manifiesto que ambos eran ligeramente mayores 6 h después de inyección del conjugado de ARNip-polímero. Los niveles de ambos volvieron a los valores iniciales 15 en 48 h. No se midió toxicidad estadísticamente significativa con la dosis eficaz mínima en ratones o ratas. Estos resultados indican que el sistema de suministro dirigido era bien tolerado.

Ejemplo 12. Los ARNip tenían las siguientes secuencias:

ARNip para apoB:

codificante 5' GGAAUCuuAuAuuGAUCcAsA 3' (SEQ ID 1)

sentido contrario 5' uuGGAUcAAAUuAAGAUUCcscsU 3' (SEQ ID 2)

ARNip para factor VII

codificante 5' GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTdT 3' (SEQ ID 3)

sentido contrario 5' GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT 3' (SEQ ID 4)

20 minúsculas = sustitución 2'-O-CH<sub>3</sub>

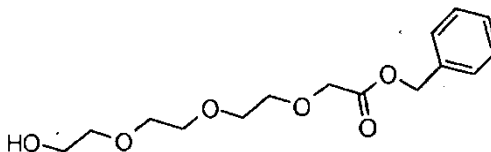
s = unión fosforotioato

f después de nucleótido = sustitución 2'-F

d antes de nucleótido = 2'-desoxi

Ejemplo 13. Síntesis de agrupación de GalNAc .

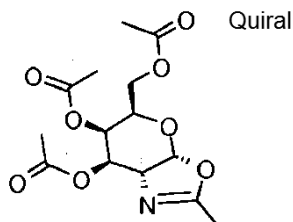
25 A. Éster bencílico del ácido {2-[2-(2-Hidroxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-acético



30 Se disolvió el 2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etanol (62,2 g, 414 mmol) en atmósfera de argón en 875 ml de DMF abs. y se enfrió a 0°C. Se añadió con cuidado NaH (12,1 g, 277 mmol, 55% en aceite mineral), se retiró el baño de hielo, se continuó agitando durante 1 h a 80°C. La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se trató con ácido bromoacético (18,98 g, 137 mmol) que se añadió mediante embudo de adición como disolución de DMF (20 ml). Después de 30 min adicionales a 75°C, se añadió bromometil-benceno (23,36 g, 137 mmol) y se dejó que la esterificación avanzara durante 30 min. El enfriamiento, vertido con cuidado sobre hielo triturado, extracción con acetato de etilo, lavado con agua, secado sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y evaporación de todos los disolventes seguido de

cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo / heptano = 8/2) dio 6,41 g del compuesto del título en forma de un aceite amarillo. MS (ISP): 299,2  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

B. Éster de (3aR,5R,6R,7R,7aR)-6-acetoxi-5-acetoximetil-2-metil-5,6,7,7a-tetrahidro-3aH-pirano[3,2-d]oxazol-7-ilo del ácido acético.

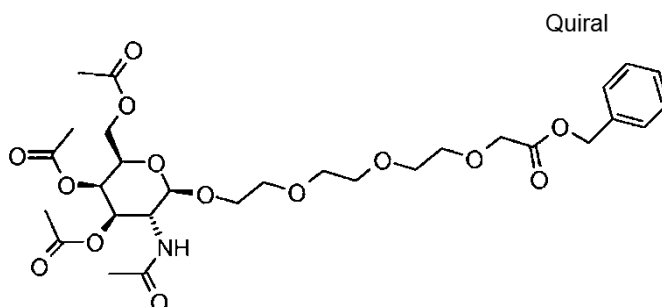


5

10

Se disolvió éster de (2S,3R,4R,5R,6R)-4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-3-acetilamino-tetrahidro-piran-2-ilo del ácido acético (10,0 g, 26 mmol) en 116 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  abs. y se trató con triflato de trimetilsililo (14,27 g, 64 mmol). La reacción se dejó avanzar durante la noche a 45°C. Después de enfriar a 0°C, se añadió trietilamina (4,88 ml, 35 mmol), la mezcla se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavó con disolución de  $\text{NaHCO}_3$  y agua. El secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y la evaporación del disolvente dieron 10,3 g del compuesto del título en forma de un aceite parduzco que se usó en la siguiente etapa sin más purificación. MS (ISP): 330,0  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

C. Éster bencílico del ácido (2-{2-[2-((2R,3R,4R,5R,6R)-4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-3-acetilamino-tetrahidro-piran-2-iloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-acético.

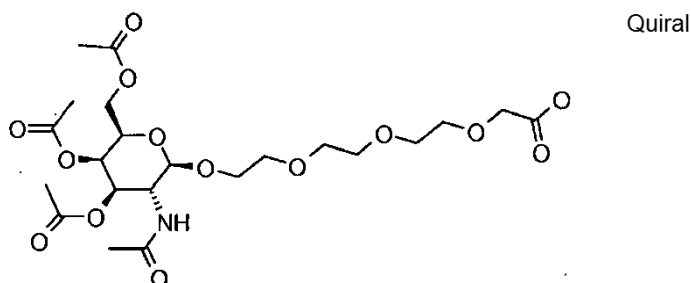


15

20

El éster de (3aR,5R,6R,7R,7aR)-6-acetoxi-5-acetoximetil-2-metil-5,6,7,7a-tetrahidro-3aH-pirano[3,2-d]oxazol-7-ilo del ácido acético (10,3 g, 26 mmol) preparado antes y el éster bencílico del ácido {2-[2-(2-hidroxi-etoxi)-etoxi]-etoxi}-acético (8,62 g, 29 mmol) se mezclaron en 520 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se trataron con 63 g de tamices moleculares de 4 Angstrom. Después de 1 h, se añadió triflato de trimetilsililo (6,13 g, 28 mmol). La mezcla de reacción se agitó a lo largo del fin de semana a temperatura ambiente. Se añadió trietilamina (5,21 ml, 37 mmol), los tamices moleculares se separaron por filtración, el filtrado se diluyó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  y agua. El secado sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y la evaporación del disolvente seguido de cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , acetato de etilo /  $\text{AcOH}$  /  $\text{MeOH}$  / agua = 60 / 3 / 3 / 2) dio 15,7 g del compuesto del título en forma de un aceite parduzco. MS (ISP): 626,6  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

D. Ácido (2-{2-[2-((2R,3R,4R,5R,6R)-4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-3-acetilamino-tetrahidro-piran-2-iloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-acético.



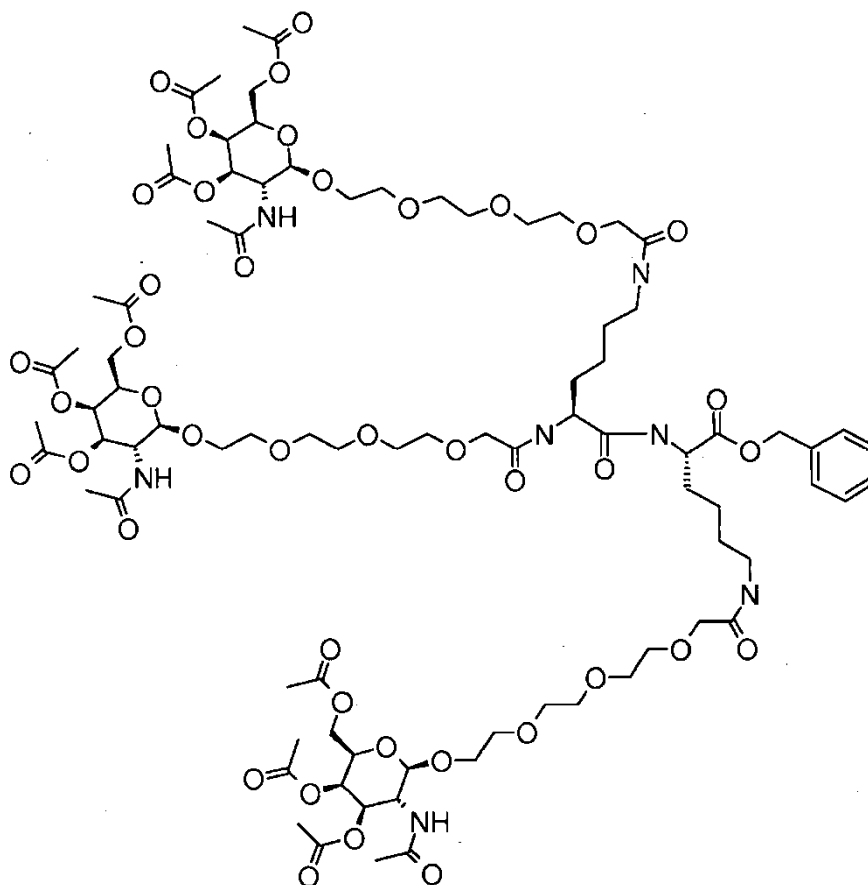
25

30

El éster bencílico del ácido (2-{2-[2-((2R,3R,4R,5R,6R)-4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-3-acetilamino-tetrahidro-piran-2-iloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-acético (15,7 g, 25 mmol) preparado antes, se disolvió en 525 ml de acetato de etilo y se hidrogenó sobre 1,6 g de  $\text{Pd} / \text{C}$  (10%) bajo 1 atm de  $\text{H}_2$  a temperatura ambiente durante 3 h. La filtración sobre Celite y evaporación del disolvente, seguido de cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  /  $\text{MeOH}$  = 80 / 20) dio 6,07 g del compuesto del título en forma de una goma parduzca. MS (ISP): 536,5  $[\text{M}-\text{H}]^-$ .

E. Éster bencílico de la agrupación de GaINAc.

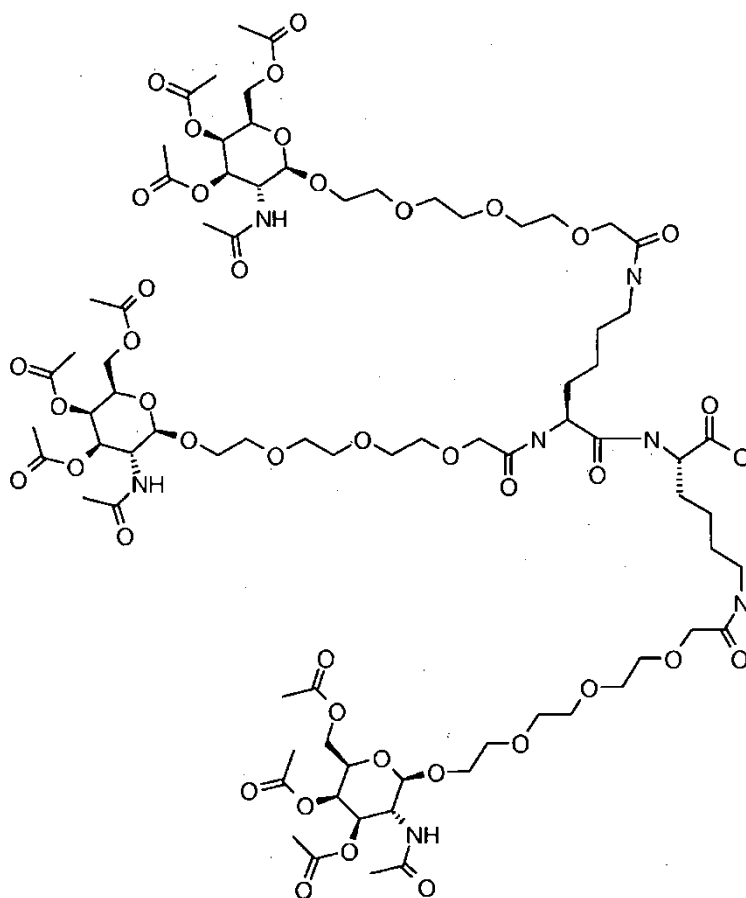
Quiral



5 El ácido (2-{2-[2-((2R,3R,4R,5R,6R)-4,5-diacetoxi-6-acetoximetil-3-acetilamino-tetrahidro-piran-2-iloxi)-etoxi]-etoxi}-etoxi)-acético (2,820 g, 5,246 mmol) preparado antes y el hidrocloreto del éster bencílico del ácido (S)-6-amino-2-((S)-2,6-diamino-hexanoilamino)-hexanoico (véase la preparación a continuación, 0,829 g, 1,749 mmol) se disolvieron en una mezcla de 32 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 3,2 ml de DMF, se trataron sucesivamente con base de Hünig (2,096 ml, 12,25 mmol), 1-hidroxil-7-azabenzotriazol (0,714 g, 5,248 mmol) e hidrocloreto de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (1,006 g, 5,248 mmol), y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Se separaron todos los disolventes a vacío, y la mezcla de reacción bruta se purificó por HPLC preparativa (38 ejecuciones, Gemini, 5  $\mu$ , C18) para dar después de liofilización 1,650 g del producto del título en forma de un polvo blanco. MS (ISP): 1945,8  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ . RMN (600 MHz, DMSO).

15 F. Ácido libre de la agrupación de GaINAc. Ácido (17S,20S)-1-((2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-20-(1-((2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)-11-oxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadecan-16-il)-17-(2-(2-(2-(2-(2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)-tetrahidro-2H-piran-2-iloxi)etoxi)etoxi)etoxi)acetamido)-11,18-dioxo-3,6,9-trioxa-12,19-diazahenicosan-21-oico.

Quiral



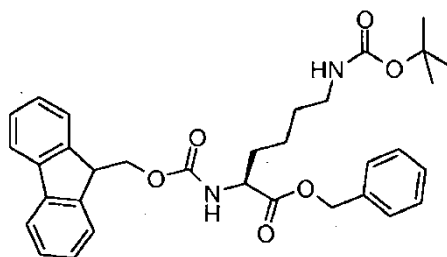
5

El éster bencílico de la agrupación de GalNAc anterior (0,674 g, 0,350 mmol) se disolvió en 50 ml de MeOH y se hidrogenó sobre 0,065 g de Pd / C (10%) a 1 atm de H<sub>2</sub> a temperatura ambiente durante 4 h. La filtración a través de Celite y evaporación del disolvente, dejó 0,620 g del compuesto del título en forma de una espuma blanca. MS (ISP): 1917,0 [M+2H]<sup>2+</sup>. RMN (600 MHz, DMSO).

Ejemplo 14. Hidrocloruro del éster bencílico del ácido (S)-6-amino-2-((S)-2,6-diamino-hexanoilamino)-hexanoico. La unidad estructural hidrocloruro del éster bencílico del ácido (S)-6-amino-2-((S)-2,6-diamino-hexanoilamino)-hexanoico se sintetizó como sigue:

A. Éster bencílico del ácido (S)-6-terc-butoxicarbonilamino-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoico.

10

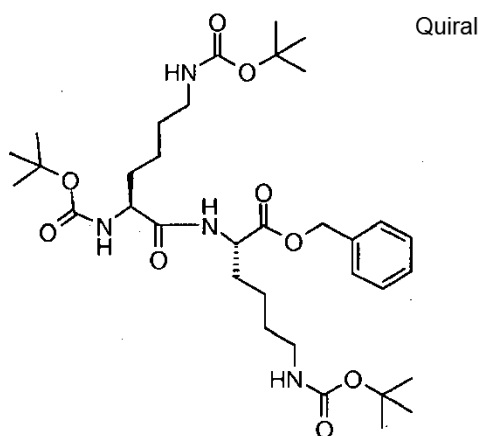


15

El ácido (S)-6-terc-butoxicarbonilamino-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxicarbonilamino)-hexanoico (5,00 g, 10,67 mmol) y fenil-metanol (2,305 g, 21,34 mmol) se disolvieron en 25 ml de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se trataron sucesivamente con N-hidroxibenzotriazol (1,933 g, 11,74 mmol), hidrocloruro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 2,250 g, 11,74 mmol), y etil-diisopropil-amina (2,137 ml, 12,49 mmol). Después de agitar durante 90 min, los productos volátiles se separaron a vacío a temperatura ambiente, el residuo se recogió en acetato de etilo, se lavó con agua, solución de NH<sub>4</sub>Cl y salmuera, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, y se evaporó. Después la mezcla bruta se disolvió en 20 ml de etanol y el producto precipitó por adición de 10 ml de agua. La filtración y secado dieron 5,669 g del compuesto del título que se recristalizó en etanol / hexano para dar 4,27 g del éster bencílico puro. MS (ISP): 559,2 [M+H]<sup>+</sup>.



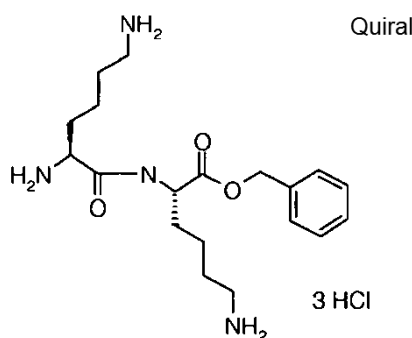
B. Éster bencílico del ácido (S)-2-((S)-2,6-Bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoilamino)-6-terc-butoxicarbonilamino-hexanoico.



5 El éster bencílico del ácido (S)-6-terc-butoxicarbonilamino-2-(9H-fluoren-9-ilmetoxi-carbonilamino)-hexanoico (4,270 g, 7,643 mmol) preparado antes se disolvió en 15 ml de THF y se trató con 15 ml de dietilamina. Después de 4 h a temperatura ambiente, el análisis por MS y TLC indicaban la ausencia de material de partida. La evaporación de los disolventes y secado azeotrópico con tolueno dieron 4,02 g de la amina libre que se usó directamente en la siguiente etapa.

10 El ácido (S)-2,6-bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoico (3,177 g, 9,17 mmol) disponible en el comercio se disolvió en 13 ml de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se trató a  $0^\circ\text{C}$  con etil-diisopropil-amina (4,71 ml, 27,5 mmol), tetrafluoroborato de O-(1,2-dihidro-2-oxo-pyridil)-1,1,3,3-tetrametiluronio (TPTU, 2,725 g, 9,172 mmol) y, 15 min después, con la amina preparada antes como una disolución en la cantidad mínima de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y 1,57 ml de etil-diisopropil-amina (1,2 eq.). La reacción se dejó avanzar durante 2 h a temperatura ambiente. Todos los productos volátiles se separaron a vacío, el residuo se recogió en acetato de etilo, se lavó con disolución de  $\text{NaHCO}_3$ , disolución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y agua, se secaron sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y se evaporaron. La cromatografía ultrarrápida ( $\text{SiO}_2$ , heptano / acetato de etilo = 4 / 6) seguido de cristalización en heptano/cantidad mínima de acetato de etilo, produjo 4,516 g del compuesto del título en forma de un sólido blanco. MS (ISP): 665,4  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

C. Trihidrocloruro del éster bencílico del ácido (S)-6-amino-2-((S)-2,6-diamino-hexanoilamino)-hexanoico.



20 El éster bencílico del ácido (S)-2-((S)-2,6-bis-terc-butoxicarbonilamino-hexanoilamino)-6-terc-butoxicarbonilamino-hexanoico (4,516 g, 6,793 mmol) preparado antes se disolvió en HCl 4 mol/l en dioxano. Después de un par de minutos, evolucionó el gas y se formó un precipitado. Después de 3 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se evaporó con cuidado y se secó escrupulosamente para dar 3,81 g del compuesto del título en forma de una espuma blanquecina que se usó sin más purificación para el ejemplo 13. E. Éster bencílico de la agrupación de *GalNAc anterior*. MS (ISP): 365,3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .

Ejemplo 15. Conjugados de agrupación de GalNAc-ARNip

30 A. El compuesto 1 (150 mg, 0,082 mmol) se disolvió en metanol seco (5,5 ml) y se añadieron 42  $\mu\text{l}$  de metilato sódico (solución al 25% en MeOH). La mezcla se agitó en atmósfera de argón durante 2 h a t.a. Se añadió una cantidad igual de metanol así como porciones de material de intercambio iónico Amberlite IR-120 para generar un pH de aproximadamente 7,0. El material Amberlite se separó por filtración. La disolución se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , y el disolvente se separó a presión reducida. El compuesto 2 se obtuvo con rendimiento cuantitativo en forma de una espuma blanca. TLC ( $\text{SiO}_2$ , diclorometano (DCM)/MeOH 5:1 +  $\text{CH}_3\text{COOH}$  al 0,1%):  $R_f$  2 = 0,03; para la detección se usó una disolución de ácido sulfúrico (5%) en MeOH seguido de calentamiento. ESI-MS, inyección directa, modo negativo;  $[\text{M}-\text{H}]^-$  calculado: 1452,7;  $[\text{M}-\text{H}]^-$  medido: 1452,5.

B. *El compuesto 2* (20 mg, 0,014 mmol) se coevaporó con piridina en diclorometano. El residuo se disolvió en DMF seca (0,9 ml) y se añadió una disolución de N-hidroxisuccinimida (NHS) en DMF (1,6 mg, 0,014 mmol) con agitación en atmósfera de argón. A 0°C se añadió lentamente una disolución de N,N'-diciohexilcarbodiimida (DCC) en DMF (3,2 mg, 0,016 mmol). La reacción se dejó calentar a t.a. y se agitó durante la noche. El compuesto 3 se usó sin más purificación para la conjugación con el ARN.

C. Síntesis del ARN modificado con amino. El ARN equipado con un conector C-6-amino en el extremo 5' del sentido de la cadena, se produjo por procedimientos químicos de fosforamidita convencionales en fase sólida a escala de 1215  $\mu\text{mol}$  usando un  $\text{\AA}$ KTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y vidrio de poro controlado como soporte sólido. El ARN que contenía 2'-O-metil-nucleótidos se generó usando las correspondientes fosforamiditas, 2'-O-metil-fosforamiditas y TFA-hexilamino-conector amidita. La escisión y desprotección así como la purificación, se lograron por métodos conocidos en la materia (Wincott F., et al, *NAR* 1995, 23,14,2677-84).

El ARN modificado con amino se caracterizó por HPLC de intercambio aniónico (pureza: 96,1%) y la identidad se confirmó por ESI-MS ( $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  calculado: 6937,4;  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  medido: 6939,0. Secuencia: 5'-( $\text{NH}_2\text{C}_6$ )GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAsA-3' (SEQ ID 1); u,c: 2'-O-metil-nucleótidos de las bases correspondientes, s: fosforotioato.

D. Conjugación de la agrupación de GalNAc al ARN. ARN (2,54  $\mu\text{mol}$ ) equipado con un conector amino C-6 en el extremo 5' se liofilizó y se disolvió en 250  $\mu\text{l}$  de tampón de borato sódico (borato sódico 0,1 mol/l, pH 8,5, KCl 0,1 mol/l) y 1,1 ml de DMSO. Después de añadir 8  $\mu\text{l}$  de N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA), se añadió lentamente una disolución del compuesto 3 (teórico 0,014 mmol) en DMF con agitación continua, a la disolución de ARN. La mezcla de reacción se agitó a 35°C durante la noche. La reacción se controló usando RP-HPLC (Resource RPC 3 ml, tampón: A: acetato de trietilamonio 100 mM (TEAA, 2,0 M, pH 7,0) en agua, B: TEAA 100 mM en acetonitrilo al 95%, gradiente: de 5% de B a 22% de B en 20 VC). Después de precipitar el ARN usando acetato sódico (3 M) en EtOH a -20°C, el conjugado de ARN se purificó usando las condiciones descritas antes. Las fracciones puras se juntaron y el conjugado 4 deseado se precipitó usando acetato sódico/EtOH para dar el conjugado de ARN puro. El conjugado 4 se aisló con 59 % de rendimiento (1,50  $\mu\text{mol}$ ). La pureza del conjugado 4 se analizó por HPLC de intercambio aniónico (HPLC: 85,5%) y la identidad se confirmó por ESI-MS ( $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  calculado: 8374,4;  $[\text{M}+\text{H}]^{1+}$  medido: 8376,0. (FIG. 6).

E. *El conjugado 4 (cadena codificante) se asoció con una cadena de sentido contraria modificada con 2'-O-metilo.* Secuencia: 5'-uuGGAUCAAAuAuAAGAUUCcscsU-3' (SEQ ID 2). El conjugado de ARNip dirigido contra el ARNm de apolipoproteína B se generó mezclando una disolución equimolar de cadenas complementarias en tampón de asociación (fosfato sódico 20 mM, pH 6,8; cloruro sódico 100 mM), se calentó en un baño de agua a 85-90°C durante 3 min, y se enfrió a t.a. a lo largo de un periodo de 3-4 h. La formación de dúplex se confirmó por electroforesis en gel sin modificar.

Ejemplo 16. Conjugados de grupo hidrófobo-ARNip. (SEQ ID 3):



La síntesis de ARN se llevó a cabo en fase sólida por procedimientos químicos de fosfoaramidita convencionales en un  $\text{\AA}$ KTA Oligopilot 100 (GE Healthcare, Freiburg, Alemania) y vidrio de poro controlado (CPG) como soporte sólido.

La cadena codificante modificada con 5'-éster C10-NHS, (NHSC10)GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfC-fUfUfACfdTsdT (SEQ ID 3) se preparó usando la 5'-amidita C10 modificador de Carboxi de Glen Research (Virginia, EE.UU.). El ARN activado, todavía unido al soporte sólido se usó para la conjugación con aminas lipófilas citadas en la siguiente tabla. Cf y Uf son 2'-fluoronucleótidos de las bases correspondientes y s es una unión fosforotioato.

Secuencia de la cadena codificante: 5'-(COC9)GGAUfCfAUfCfUfCfAAGUfCfUfUfACfdTsdT-3' (SEQ ID 3)

Secuencia de la cadena de sentido contrario: 5'-GUfAAGACfUfUfGAGAUfGAUfCfCfdTsdT-3' (SEQ ID 4)

Se mezclaron 100 mg de la cadena codificante CPG (carga 60  $\mu\text{mol/g}$ , 0,6  $\mu\text{mol}$  de ARN) con 0,25 mmol de la correspondiente amina obtenida de Sigma Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Alemania) o Fluka (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza).

Tabla 16. Aminas lipófilas usadas en la formación de conjugados de grupo hidrófobo-ARNip

Nº	Amina lipófila	mg	mmol	ml de disolvente
2	N-Hexilamina	25	0,25	1 ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
3	Dodecilamina	50	0,25	0,55 ml de CH <sub>3</sub> CN, 0,45 ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
4	Octadecilamina	67	0,25	1 ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
5	Didecilamina	74	0,25	1 ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
6	Didodecilamina	88	0,25	1 ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
7	Diocadecilamina	67	0,12	0,45 ml de CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> , 0,45 ml de ciclohexano

- 5 La mezcla se agitó durante 18 h a 40°C. El ARN se escindió del soporte sólido y se desprotegió con una disolución acuosa de hidróxido amónico (NH<sub>3</sub>, al 33 %) a 45°C durante la noche. El grupo protector en 2' se separó con TEAx3HF a 65°C durante 3,5 h. Los oligonucleótidos se purificaron por RP-HPLC (Resource RPC 3 ml, tampón: A: TEAA 100 mM en agua, B: TEAA 100 mM en CH<sub>3</sub>CN al 95%, gradiente: de 3% de B a 70% de B en 15 VC, excepto para el nº 7: gradiente de 3% de B a 100% de B en 15 VC).

Tabla 17. Conjugados de grupo-hidrófobo-ARN, caracterizados por RP- HPLC y ESI-MS (modo negativo).

Nº	Pureza por RP-HPLC %	ESI-MS [M-H] calculado	ESI-MS [M-H] encontrado
2	90	6963,4	6963,0
3	99	7047,4	7047,2
4	98	7131,5	7131,4
5	99	7159,6	7159,3
6	99	7215,7	7215,0
7	98	7384,0	7383,2

- 10 Para generar el ARNip a partir del ARN monocatenario, se mezclaron cantidades equimolares de las cadenas codificante y de sentido contrario complementarias en tampón de asociación (fosfato sódico 20 mM, pH 6,8; cloruro sódico 100 mM), se calentó a 80°C durante 3 min, y se enfrió a t.a. a lo largo de un periodo de 3-4 h. Los ARNip, que se dirigen contra el ARNm del factor VII, se caracterizaron por electroforesis en gel.



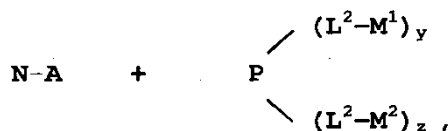
**Lista de secuencias**

- 5 <110> Arrowhead Research Corporation  
 Rozema, David  
 Lewis, David  
 Wakefield, Darren  
 Hoffman, Torsten  
 Mohr, Peter  
 Hadwiger, Philipp  
 10 Thuer, Wilma  
 Valis, Linda  
 Kitas, Eric
- 15 <120> Composiciones para el suministro dirigido de ARNip  
 <130> 4/2MZ29/20
- 20 <140> EP 11703711.9  
 <141> 18-02-2011  
 <150> US 61/307.490  
 <151> 24-02-2010
- 25 <160> 4  
 <170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
 <223> cadena codificante de ARNbc de Mus musculus
- 40 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 21  
 <223> 5'-fosforotioato de adenosina
- 45 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 7, 8, 10, 12, 13, 14, 19  
 <223> 2'-O-metilo del nucleósido correspondiente
- <400> 1  
 ggaaucuuau auuugaucca a 21
- 50 <210> 2  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial
- 55 <220>  
 <223> cadena de sentido contrario de ARNbc de Mus musculus
- 60 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 22  
 <223> 5'-fosforotioato de citidina
- 65 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 22  
 <223> 5'-fosforotioato de uridina

<220>  
 <221> base modificada  
 <222> 1, 2, 7, 11, 13, 18, 21, 22  
 5 <223> 2'-O-metilo del nucleósido correspondiente  
  
 <400> 2  
  
 uuggaucaaa uauaagauuc ccu 23  
 10  
 <210> 3  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> cadena codificante de ARNbc de Mus musculus  
  
 <220>  
 20 <221> base modificada  
 <222> 1, 2, 3, 6, 11, 12, 13, 18  
 <223> 2'-hidroxi del nucleósido correspondiente  
  
 <220>  
 25 <221> base modificada  
 <222> 4, 5, 7, 8, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 19  
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoro del nucleósido correspondiente  
  
 <400> 3  
 30 ggaucaucuc aagucuuact t 21  
  
 <210> 4  
 <211> 21  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cadena de sentido contrario de ARNbc de Mus musculus  
 40  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13, 15, 16  
 <223> 2'-hidroxi del nucleósido correspondiente  
 45  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 2, 7, 8, 9, 14, 17, 18, 19  
 <223> 2'-desoxi-2'-fluoro del nucleósido correspondiente  
 50  
 <220>  
 <221> base modificada  
 <222> 21  
 <223> 5'-fosforotioato de timidina  
 55  
 <400> 4  
  
 guaagacuug agaugaucct t 21  
 60

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de suministro de conjugado para suministrar polinucleótido de ARN interferente a una célula hepática in vivo, que comprende:



5 en donde,

**P** es una poliamina activa en la membrana anfipática;

**L<sup>2</sup>** es una unión lábil frente al pH

**M<sup>1</sup>** es un agente de enmascaramiento de carga neutra que contiene un derivado de galactosa,

**M<sup>2</sup>** es un agente de enmascaramiento de carga neutra que contiene un polietilenglicol,

10 **N** es un polinucleótido de ARN interferente,

**A** es un trímero de galactosa o un grupo hidrófobo que tiene al menos 20 átomos de carbono,

**y** es un número entero mayor o igual a 1 y **z** es un número entero mayor o igual a 0, en donde el valor de **y** y **z** juntos es mayor que 50% del número de aminas de la poliamina **P**;

15 la carga positiva de la poliamina **P** se neutraliza y la actividad en la membrana de la poliamina **P** es inhibida reversiblemente por unión de **M<sup>1</sup>** y **M<sup>2</sup>** por la unión lábil frente al pH **L<sup>2</sup>**, y la escisión de **L<sup>2</sup>** en respuesta a una disminución del pH restablece la actividad en la membrana de la poliamina **P**;

**N** y **A** no están, directa o indirectamente, covalentemente unidos a **P**, **L<sup>2</sup>**, **M<sup>1</sup>** o **M<sup>2</sup>**.

20 2. Sistema de suministro según la reivindicación 1, en donde la poliamina activa en la membrana anfipática se puede obtener por polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina y monómeros que contienen grupo hidrófobo inferior; o por polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina, monómeros que contienen grupo hidrófobo inferior y monómeros con grupo hidrófobo superior;

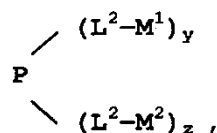
3. Sistema de suministro según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde **L<sup>2</sup>** es una unión maleamato.

4. Sistema de suministro según la reivindicación 3, en donde **L<sup>2</sup>** es una unión maleamato disustituido.

25 5. Sistema de suministro según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la célula hepática es un hepatocito.

6. Sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el polinucleótido de ARN interferente se selecciona del grupo que consiste en: ARNbc, ARNip y miARN.

7. Sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde



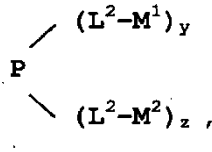
30 es soluble en agua.

8. Sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde **P** es un copolímero aleatorio.

9. Sistema de suministro de la reivindicación 8, en donde **P** es un copolímero aleatorio de poli(éter vinílico) y poliacrilato.

35 10. Sistema de suministro de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el valor de **y** y **z** juntos es mayor que 60%, preferiblemente mayor que 70% del número de aminas de la poliamina **P**.

11. Sistema de suministro de la reivindicación 1, en donde



tiene un potencial zeta entre 0 y -20 mV a pH 8.

5 12. Sistema de suministro de la reivindicación 1, en donde la relación del derivado de galactosa al polietilenglicol PEG unido a P es de 1 a 0,5-2.

13. Sistema de suministro de la reivindicación 1, en donde el derivado de galactosa consiste en N-acetilgalactosamina.

14. Sistema de suministro de la reivindicación 1, en donde el trímero de galactosa consiste en trímero de N-acetilgalactosaminas.

10 15. Un método para la fabricación de una composición de suministro de oligonucleótido de ARN interferente, que comprende:

a) formar una poliamina activa en la membrana anfipática, dicha poliamina activa en la membrana se puede obtener preferiblemente por polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina y monómeros que contienen grupo hidrófobo inferior; o por polimerización aleatoria de monómeros que contienen amina, monómeros que contienen grupo hidrófobo inferior y monómeros con grupo hidrófobo superior;

15 b) formar un primer agente de enmascaramiento que comprende un anhídrido maleico disustituido de carga neutra que contiene un derivado de galactosa;

c) formar un segundo agente de enmascaramiento que comprende un anhídrido maleico disustituido de carga neutra que contiene un polietilenglicol;

20 d) inhibir reversiblemente la actividad en la membrana de la poliamina activa en la membrana anfipática, en donde la inhibición consiste en la modificación de 50% o más de las aminas en la poliamina, haciendo reaccionar la poliamina con el primero y el segundo agentes de enmascaramiento, uniendo así una pluralidad de derivados de galactosa y una pluralidad de polietilenglicoles al polímero activo en la membrana por uniones de maleamato disustituido lábiles frente al pH en condiciones fisiológicas; y,

25 e) unir el polinucleótido de ARN interferente al trímero de galactosa o un grupo hidrófobo que tiene al menos 20 átomos de carbono;

f) proporcionar el polinucleótido de ARN interferente y la poliamina activa en la membrana reversiblemente inhibida en disolución adecuada para la administración in vivo.

30 en donde dicho nucleótido de ARN interferente unido a dicho trímero de galactosa o un grupo hidrófobo que tiene al menos 20 átomos de carbono, no está unido covalentemente, directa o indirectamente, a dicha poliamina activa en la membrana reversiblemente inhibida.



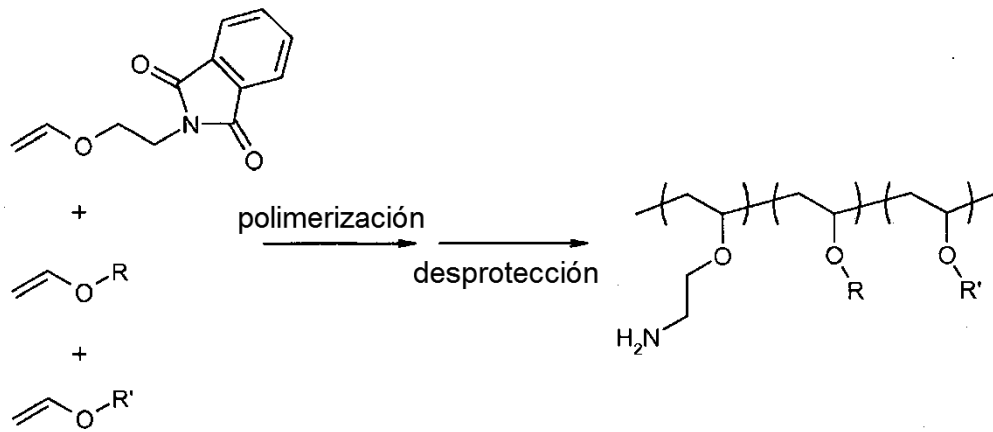


FIG. 1

Expresión de ApoB en ratones después de administración del conjugado de ARNip-colesterol + polímero de suministro reversiblemente modificado

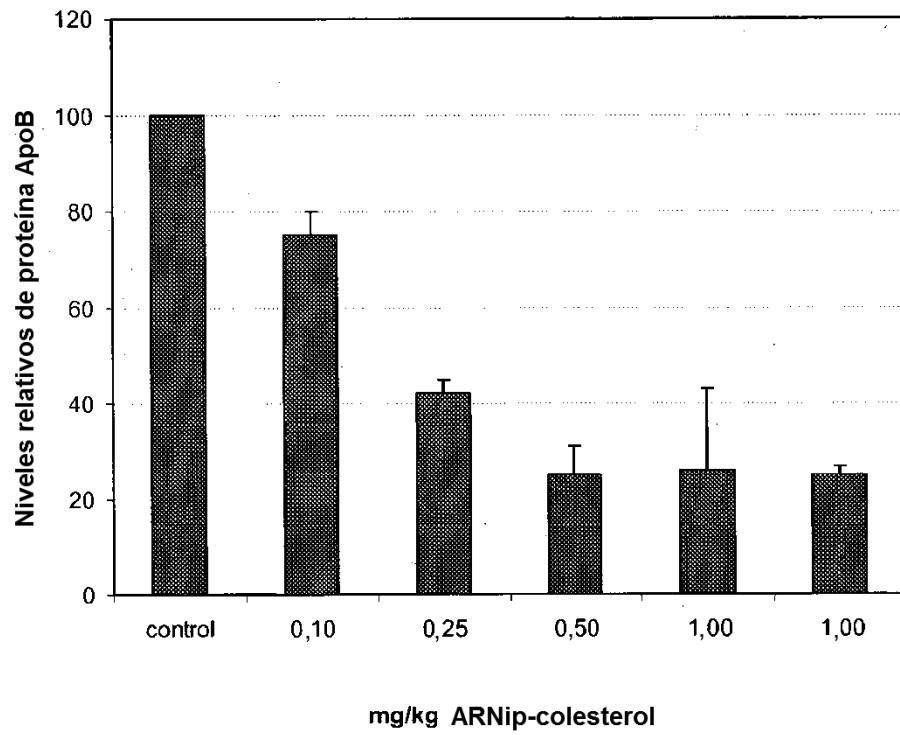


FIG. 2

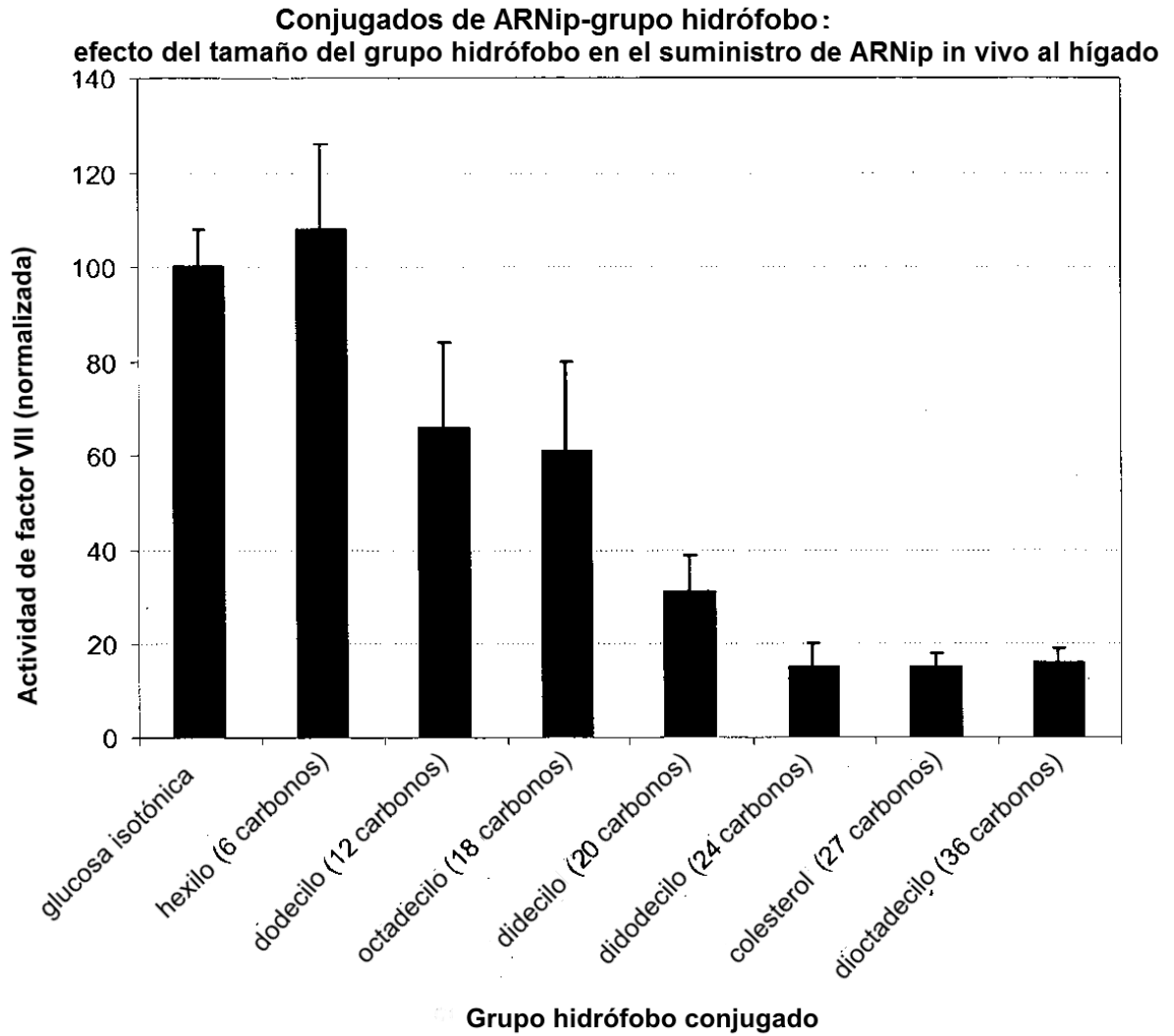


FIG. 3

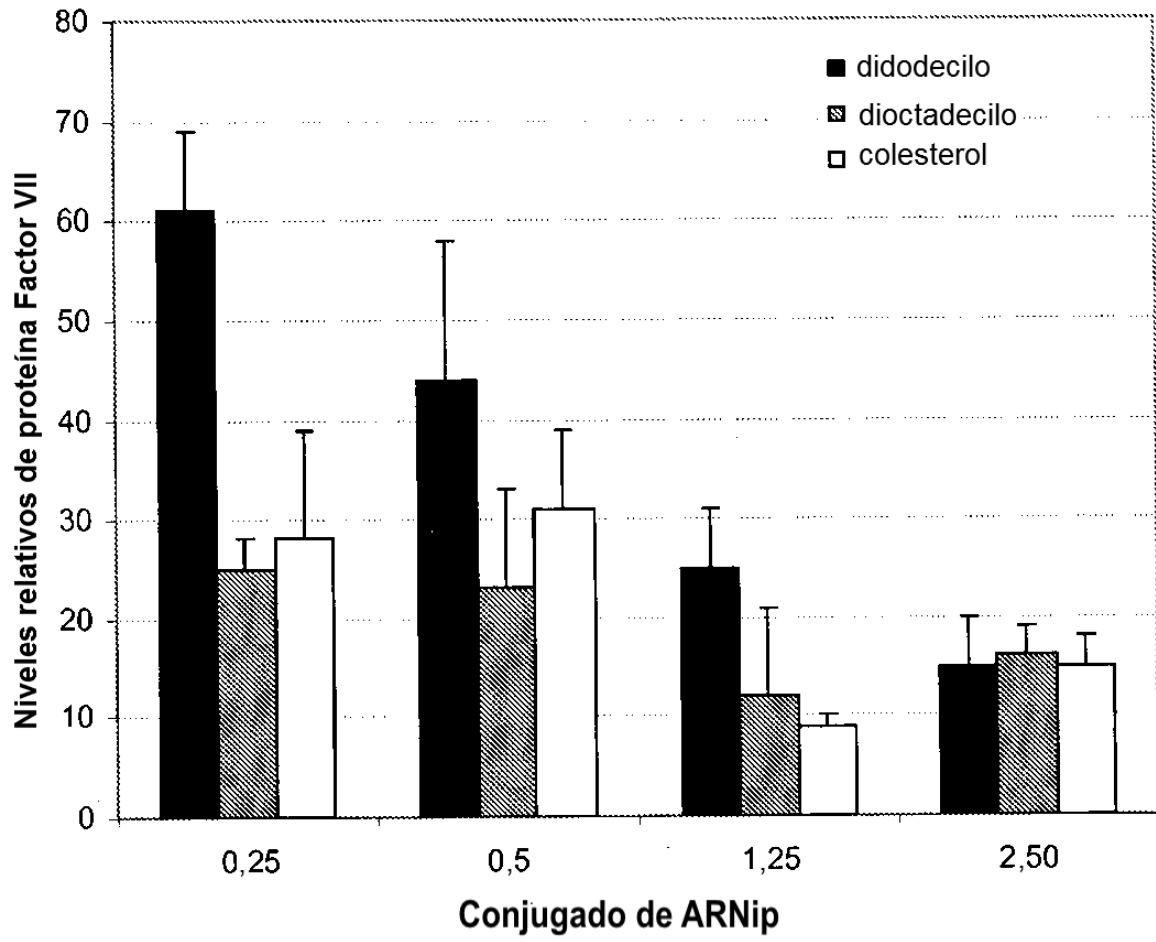


FIG. 4

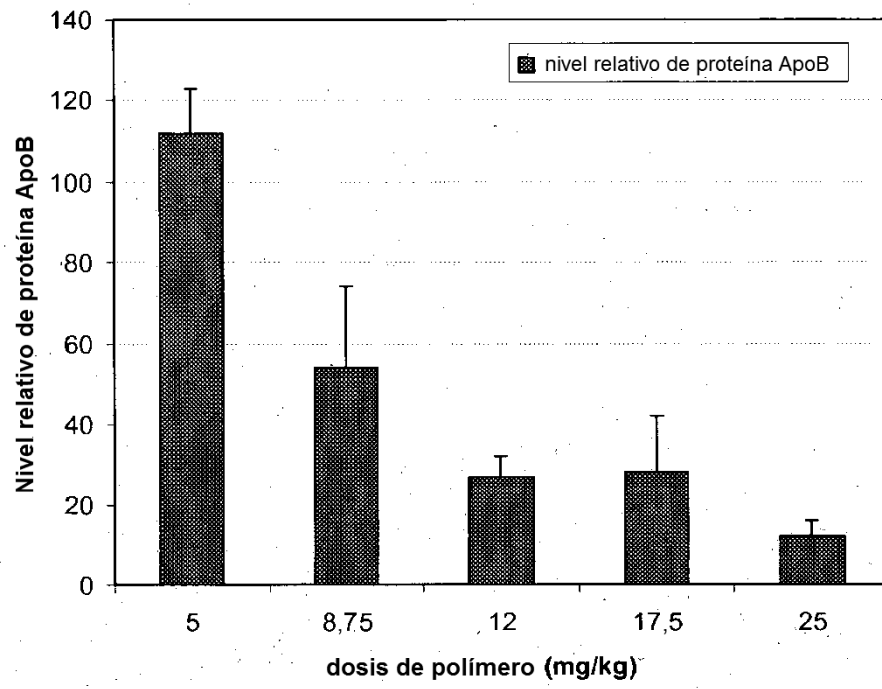


FIG. 5

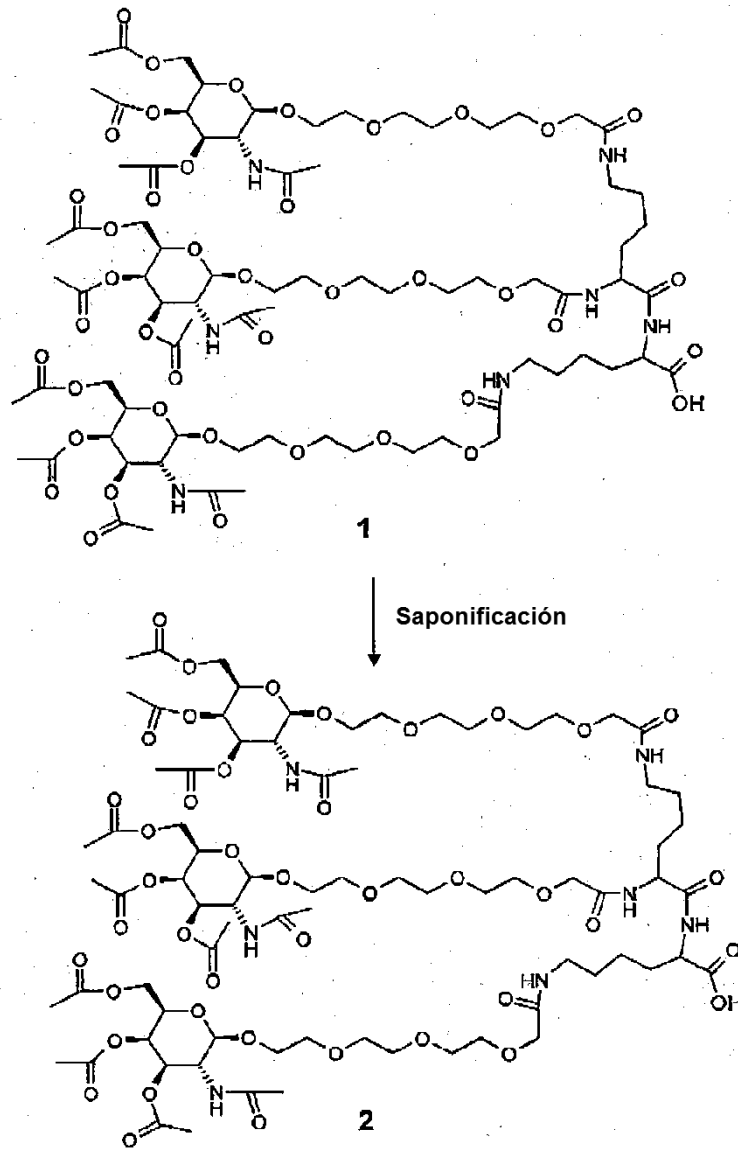


FIG.6

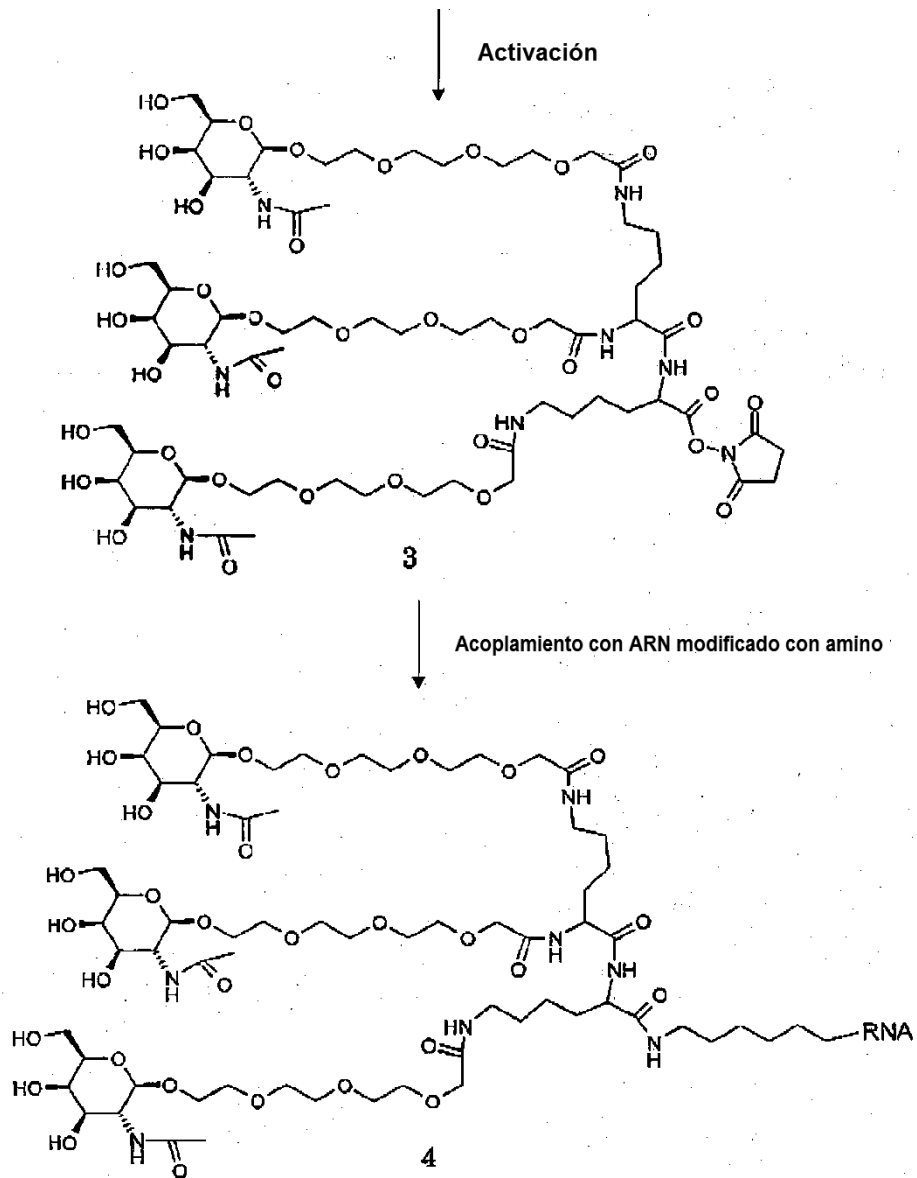


FIG.6 (CONT.)