

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 899 043**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)
A61K 9/16 (2006.01)
A61K 47/60 (2007.01)
A61K 31/713 (2006.01)
A61K 47/54 (2007.01)
A61K 47/55 (2007.01)
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/KR2012/010967**
 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.06.2013 WO13089522**
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12857568 (5)**
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 2796150**

54 Título: **Novedosos conjugados de oligonucleótidos y su uso**

30 Prioridad:

15.12.2011 KR 20110135162
05.01.2012 KR 20120001710

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.03.2022

73 Titular/es:

BIONEER CORPORATION (100.0%)
8-11 Munpyeongseo-ro, Daedeok-gu
Daejeon 306-220, KR

72 Inventor/es:

CHAE, JEIWOOK;
HAN, BORAM;
KIM, HAN-NA;
PARK, HAN OH;
YOON, PYOUNG OH;
KIM, SUN GI;
JUNG, KWANG-JU;
KWON, TAEWOO;
CHOI, JONG DEOK;
LEE, SAM YOUNG y
JUNG, EUN-JUNG

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 899 043 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

Novedosos conjugados de oligonucleótidos y su uso

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una nueva estructura de oligonucleótido que lleva unidos a ella materiales hidrófilos e hidrófobos, que mejoran la administración de oligonucleótidos monocatenarios o bicatenarios útiles para el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas, y al uso de los mismos.

10 Un primer aspecto de la presente invención se refiere a una estructura de oligo ARN de doble hélice que comprende un ligando específico de diana unido a un material hidrófilo contenido en la estructura, una nanopartícula compuesta por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unidas a ligando, una composición farmacéutica que comprende la estructura de ARN, una composición farmacéutica que comprende una nanopartícula compuesta por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unidas a ligando, un procedimiento para preparar la estructura, un procedimiento para preparar una nanopartícula compuesta por las estructuras de ARN y una técnica para la administración de la estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando.

20 Se describe, además, un conjugado de oligonucleótido antisentido (de ahora en adelante denominado "ASO") que comprende un material hidrófilo y un material hidrófobo unidos a ambos extremos del ASO por medio de un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador para mejorar la eficacia de la administración intracelular del ASO, un procedimiento para preparar el conjugado y una técnica para la administración de una nanopartícula compuesta de conjugados de ASO.

25 **Antecedentes de la técnica**

Desde que se encontró el papel desempeñado por el ARN de interferencia (en adelante denominado 'ARNi'), se ha encontrado que el ARNi actúa en un ARNm específico de secuencia sobre varias células de mamíferos (Silence of the transcripts: RNA interference in medicine. J Mol Med (2005) 83: 764-773). Cuando un ARN de doble cadena largo se administra a las células, el ARN suministrado es procesado por la endonucleasa dicer en ARN de interferencia pequeño de 21-23 pares de bases (bp) (en lo sucesivo denominado 'ARNsi'). El ARNsi se une a RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN) e inhibe la expresión del gen diana de una manera específica de secuencia mediante el proceso en el que la cadena antisentido reconoce y degrada el ARNm diana (NUCLEIC-ACID THERAPEUTICS: BASIC PRINCIPLES AND RECENT APPLICATIONS. Nature Reviews Drug Discovery. . 2002. 1, 503-514).

35 Bertrand et al. Informaron que el ARNsi tiene un excelente efecto inhibitorio sobre la expresión de mRNA *in vitro* e *in vivo* en comparación con un oligonucleótido antisentido (ASO) para el mismo gen diana y que el efecto es duradero (Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. 296: 1000-1004). Además, debido a que el ARNsi se une de manera complementaria al mRNA diana para regular la expresión del gen diana de una manera específica de secuencia, puede usarse ventajosamente en una amplia gama de aplicaciones en comparación con los fármacos convencionales a base de anticuerpos o de productos químicos (fármacos de moléculas pequeñas) (Progress Towards in Vivo Use of siRNAs. Molecular Therapy . 2006 13(4):664-670).

45 El ARNsi tiene excelentes efectos y puede usarse en una amplia gama de aplicaciones, aunque para que el ARNsi se desarrolle en agentes terapéuticos celulares, es necesario mejorar la estabilidad y la eficacia de la administración intracelular del ARNsi para poder administrar eficazmente el ARNsi en sus células diana (Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development. Drug Discov. Today. 2006 Jan; 11(1-2):67-73).

50 En un intento por satisfacer estos requisitos, se han usado análogos o vehículos resistentes a la nucleasa, tales como vectores virales, liposomas o nanopartículas.

Los vehículos virales tales como adenovirus o retrovirus tienen una alta eficacia de transfección, pero conllevan los riesgos de inmunogenicidad y de oncogenicidad. Sin embargo, se evalúa que los vehículos no virales, incluidas las nanopartículas, tienen una baja eficacia de administración intracelular en comparación con los vehículos virales, pero tienen ventajas, tales como una alta seguridad *in vivo*, una administración específica de la diana, captación e internalización eficientes de oligonucleótidos de ARNi en células o tejidos, y baja citotoxicidad y estimulación inmunitaria. Por lo tanto, estos vehículos no virales son considerados como el procedimiento de administración más prometedor que hace que inhiban eficazmente la expresión del gen diana (Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. J. Clin Invest. 2007 December 3; : 3623-3632).

65 Se han desarrollado sistemas de administración con varias nanopartículas para la administración específica del cáncer. Los sistemas de nanopartículas de este tipo suelen diseñarse de tal manera que la superficie está recubierta con un material hidrófilo para aumentar el tiempo de circulación en la sangre y se carga positivamente para aumentar la endocitosis (Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. Advanced Drug Delivery

Reviews 60 (2008) 1615-1626). Sin embargo, el tejido tumoral es muy rígido y tiene una difusión limitada, a diferencia del tejido normal, y supera la limitación a la difusión al formar por angiogénesis vasos sanguíneos en la región circundante, ya que esta limitación a la difusión tiene efectos adversos en la migración de nutrientes necesarios para el tumor y materiales de desecho tales como el oxígeno y el dióxido de carbono. Los vasos sanguíneos formados en el tejido tumoral por la angiogénesis tienen un vaso sanguíneo defectuoso y con fugas, incluyendo un hueco con un tamaño que oscila entre los 100 nm y los 2 μ m, dependiendo del tipo de tumor.

Por lo tanto, las nanopartículas pasan fácilmente a través del endotelio capilar del tejido canceroso que tiene un vaso sanguíneo defectuoso y con fugas, en comparación con los vasos capilares estructurados del tejido normal, de modo que son fácilmente suministrados durante su circulación en la sangre. Además, el tejido tumoral no tiene drenaje linfático, por lo que en él se acumula un fármaco. Este mecanismo se conoce como efecto de permeación y retención mejorada (EPR). Las nanopartículas se administran con facilidad de manera específica al tejido tumoral por medio de este efecto, y este mecanismo se conoce como focalización pasiva (Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urol Oncol. 2008 Jan-Feb ; 26(1) :57-64).

Para superar la distribución *in vivo* no específica, la focalización y la falta de solubilidad en agua de los fármacos terapéuticos, incluidos los fármacos contra el cáncer, se han realizado estudios para optimizar el tamaño de las nanopartículas cargadas de fármacos terapéuticos o para modificar la superficie con objeto de aumentar el tiempo de su circulación en sangre. En particular, con respecto a las nanopartículas poliméricas que comprenden conjugados de polímeros y fármacos, se han realizado estudios para mejorar la administración de fármacos anticancerosos en función de los tumores, acoplando los fármacos anticancerosos a materiales solubles en agua y biodegradables tales como albúmina, poli-L-glutamato (PGA) o un copolímero de N-(2-hidroxipropil)-metacrilamida (Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer. Clin Cancer Res 2008; 14: 1310-1316). Además, se han realizado estudios para acoplar un material anfífilo a un fármaco anticanceroso para formar micelas poliméricas, que consisten en un núcleo hidrófobo de un fármaco anticanceroso y una envoltura hidrófila (Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. J Control Release 2001; 74: 295-302).

Por lo tanto, cuando un material hidrófobo se une adicionalmente a un fármaco terapéutico tal como un fármaco anticanceroso para aumentar la fuerza cohesiva del núcleo, los micelos pueden formarse incluso a baja concentración, y se pueden formar micelas poliméricas que tienen mayor estabilidad debido al material hidrófilo de la envoltura. Un fármaco terapéutico con materiales hidrófobos e hidrófilos unidos a ambos extremos por medio de un enlace biodegradable puede formar micelas poliméricas mejoradas que pueden suministrar el fármaco terapéutico en el tejido canceroso diana.

Recientemente, como tecnología para la administración de oligo ARN de doble cadena, se ha desarrollado la tecnología de la nanopartícula SAMiRNA auto-ensamblada formada sobre la base de las características de los materiales unidos a los extremos del ácido nucleico (publicación de patente coreana expuesta a inspección pública N° 2009-0042297). SAMiRNA es una nanopartícula autoensamblada compuesta por estructuras de oligo ARN de doble cadena que tienen unidos a ellas materiales hidrófilos e hidrófobos que mejoran la administración del oligo ARN de doble cadena, y la tecnología para formar SAMiRNA puede ser una tecnología para mejorar la administración intracelular de oligo ARN de doble cadena.

Se encontró que, cuando se administró SAMiRNA marcado con una etiqueta fluorescente a la vena de cola de un modelo de ratón de xenoinjerto tumoral, mediante la focalización pasiva antes mencionada se administró la nanopartícula específicamente al tumor (ver FIG. 2).

Sin embargo, la focalización activa usa nanopartículas que tienen unido a ellas un resto de focalización. Se informó de que el resto de focalización causa la acumulación preferencial de nanopartículas en el tejido diana o mejora la internalización de nanopartículas en las células diana (Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake Trends Biotechnol. 2008 Oct; 26(10) :552-8. Epub 2008 Aug 21).

La focalización activa significa mejorar la administración de nanopartículas a las células diana usando una diana de focalización, tal como un anticuerpo o un ligando, unida a las nanopartículas. En los últimos años, se han realizado estudios para localizar los ARNi en un tejido deseado usando diversos restos diana unidos a los ARNi.

Por ejemplo, se encontró que un ARNsi que tiene α -tocoferol unido a él se administró *in vivo* de manera eficaz y estable e inhibió la expresión del gen diana por ARN de interferencia (Kazutaka Nishina et al., The American Society of Gene therapy, 2008, 16(4) :734-740) . Además, se demostró que un ARNsi con colesterol unido a él se administró más eficazmente en el tejido hepático en comparación con un péptido penetrante celular (CCP) que se usa principalmente para la administración de ARNsi (documento US-20060014289; Moschos S.A. et al., Bioconjug. Chem. 18:1450-1459). Se informó de que el efecto de administración no solo es causado por la especificidad del tejido tumoral, sino también por la especificidad de una célula dirigida por el resto de focalización unido.

La focalización activa usa materiales que tienen la capacidad de unirse a carbohidratos, receptores o antígenos, que son específicos para la superficie celular objetivo o que están sobreexpresados en la misma (Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. Mol Cancer Ther 2006; 5(8) : 1909-1917). Por lo tanto, las

nanopartículas que tienen un resto activo dirigido unido a ella se acumulan en el tejido tumoral durante su circulación en la sangre mediante la focalización pasiva, y la administración de las nanopartículas en las células diana se ve reforzada por el resto dirigido, aumentando así el efecto terapéutico del fármaco administrado en las células. Como resto diana, se usa principalmente un ligando o un anticuerpo. Se une a su receptor en la superficie celular con alta

5 avidez y especificidad y promueve la internalización de las nanopartículas por endocitosis mediada por receptores (RME) (Kinetic analysis of receptor-mediated endocytosis (RME) of proteins and peptides: use of RME as a drug delivery system. *J Control Release* 1996; 39: 191-200).

El receptor de superficie celular o el antígeno a los que van dirigidos este ligando o este anticuerpo tienen como característica que son específicos o están sobreexpresados en las células diana para facilitar el acceso del ligando diana a los mismo, aumentando así el ritmo de la endocitosis. Además, el receptor o el antígeno administran las nanopartículas que tienen el ligando unido a las células, y se reciclan de nuevo a la superficie celular (Receptor-mediated endocytosis: An overview of a dynamic process. *J. Biosci.*, Oct. 1984, 6(4), pp. 535-542.). Los restos dirigidos a los tumores son materiales que se unen específicamente a receptores tales como el factor de crecimiento epidérmico o el receptor de lipoproteínas de baja densidad, que se expresan específicamente en las líneas celulares diana, o a receptores específicos de tumores tales como el receptor folato, que se sabe que se sobreexpresan en la superficie de varias células cancerosas (Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery. *Mol Cancer Ther* 2006, 5(8): 1909-1917).

Si un resto dirigido, en particular un ligando específico del receptor que realiza la internalización por medio de la endocitosis mediada por el receptor (RME), se une al SAMiRNA, puede promover eficientemente la administración del SAMiRNA en las células diana, particularmente las células cancerosas, y así el SAMiRNA puede ser administrado a las células diana incluso a una concentración y dosis relativamente bajas de modo que el oligo ARN de doble cadena pueda exhibir alta actividad y la administración no específica del oligo ARN de doble cadena y se pueda inhibir en otros órganos y células.

20

25

El documento WO 2010/131916 A2 (BIONER CORP [KR]; HAN BO RAM [KR]; PARK HAN OH [KR]; SHIN MI SIK [KR]) 18 de noviembre de 2010 (2010-11-18); y el correspondiente documento US 2012/108803 A1 (HAN BO RAM [KR] Y OTROS) 3 de mayo de 2012 (2012-05-03) revelan un compuesto de polímero ARNsi de la siguiente estructura:

30 A-X-R-Y-B

donde, uno de A y B es un compuesto polimérico hidrófilo y el otro es un compuesto polimérico hidrófobo; X e Y son de manera independiente un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador; y R es ARNsi. Dicho conjugado puede mejorar la biostabilidad del ARNsi logrando así una administración eficiente del ARNsi terapéutico en las células y exhibiendo la actividad del ARNsi, incluso con una dosis pequeña de una concentración relativamente baja. Dichos documentos, sin embargo, no desvelan una construcción en la que un ligando seleccionado de folato, N-acetilgalactosamina y manosa están unidos covalentemente al extremo del material hidrófilo y en donde el compuesto R es un oligo ARN de doble hélice .

35

Además, la tecnología de formación SAMiRNA puede aplicarse no solo a los oligo ARN de doble cadena, sino también a los oligonucleótidos de una sola cadena, en particular a los oligonucleótidos antisentido de una sola cadena (ASO) con fines terapéuticos.

40

La tecnología ASO es la tecnología de controlar la transferencia de información del gen a la proteína cambiando el metabolismo del ARNm usando ARN monocatenario o ADN. En otras palabras, es la tecnología de realizar la inhibición preferencial de la expresión de la proteína de interés usando una secuencia de nucleótidos seleccionada que se hibrida de manera complementaria y específica a la proteína. Debido a que el ASO se une al gen diana de una manera específica de la secuencia, no influye en la expresión de los genes que no sean el gen diana. Así, la tecnología ASO puede servir como una herramienta útil en el análisis de la función *in vivo* de una proteína específica y también puede usarse como terapia génica contra una enfermedad específica (FASEBJ.9,1288-1296,1995).

45

50

En los últimos años se ha desarrollado un antagomir, que es un nuevo tipo de oligonucleótido antisentido monocatenario, y se ha usado para inhibir la función de los microRNA en las células. Se sabe que un antagomir o inhibidor de microARN (inhibidor de miARN), que es un ARN corto sintetizado químicamente, se une de manera complementaria al microARN diana para inhibir la función del microARN. Un antagomir preferentemente tiene una estructura química modificada como 2' metoxi o fosfotioato para impedir la degradación del antagomir. En la actualidad, se conocen antagomires que inhiben las funciones de miARN relacionadas con diversas enfermedades, incluyendo cáncer y fibrosis cardíaca y pulmonar ("Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'" *Nature*, Dec. 2005, 438(7068): 685-689; "MicroRNAs as Therapeutic Targets" *New England J. Medicine*, 2006, 354 (11): 1194-1195; Meister G. et al., "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing" *RNA*, Mar. 2004, 10 (3): 544-550).

55

60

El ADN antisentido se une al ARNm diana para formar un dúplex ARN/ADN, que es degradado por la ARNasa H (una clase de ribonucleasa que degrada específicamente un ARNm con un dúplex híbrido ARN/ADN formado en él *in vivo*). El ARN antisentido forma un dúplex ARN/ARN, y la degradación del ARNm diana es inducida por la ARNasa L. La ARNasa L es una ribonucleasa que degrada preferentemente el ARN monocatenario alrededor del ARN bicatenario (*Pharmacol. Toxicol.* 32.329-376, 1992).

65

Sin embargo, un ASO que comprende el inhibidor del miRNA antagomir debe ser efectivamente administrado en las células diana para lograr un efecto deseado, y el ASO puede ser degradado por ribonucleasa en la sangre. Así pues, para usar un ASO con fines terapéuticos, debe suministrarse eficazmente un conjugado de ASO a través de la membrana celular, y debe garantizarse la estabilidad del ASO *in vivo* (Shigeru Kawakami y Mitsuru Hashida, Drug Metab. Farmacokinet. 22(3): 142-151, 2007).

Por lo tanto, para la estabilidad *in vivo*, la mayoría de los ASO están en la forma de oligodesoxinucleótidos (ODN) obtenidos por diversas modificaciones que proporcionan resistencia a la nucleasa. La modificación puede ser la sustitución de un grupo -OH en la posición 2' del carbono del resto azúcar de uno o más nucleótidos con -CH₃ (metilo), -OCH₃, -NH₂, -F (flúor), -O-2-metoxietilo, -O-propilo, -O-2-metilietilo, -O-3-aminopropilo, -O-3-dimetilaminopropilo, -O-N-metilacetamido o -O-dimetilamidoxietilo; la sustitución del oxígeno del resto azúcar del nucleótido con azufre; la modificación del enlace entre los nucleótidos en un fosforotioato, borofosfato o enlace de fosfonato de metilo, o una combinación de uno o de más de uno de ellos; o modificación en forma de PNA (ácido nucleico peptídico o LNA (ácido nucleico bloqueado) (véase Crooke et al., Ann. Rev. Med. Vol.55: pp 61-65 2004,US 5.660.985,US 5.958.691,US 6.531.584,US 5.808.023,US 6.326.358,US 6.175.001Braasch D. A. et al., Bioorg. Med. Chem. Let. 14:1139-1143, 2003;Chiu Y. L. et al., RNA, 9:1034-1048, 2003;Amarzguioui M. et al., Nucleic Acid Res. 31:589-595, 2003).

Con el fin de administrar ASO en las células diana, se han desarrollado técnicas de administración de genes que usan virus tales como adenovirus o retrovirus, y técnicas de administración de genes que usan vehículos no virales tales como liposomas, lípidos catiónicos o polímeros catiónicos. Sin embargo, los vehículos virales tienen problemas en términos de seguridad, porque no se garantiza que estos vehículos no causen anomalías en las funciones normales de los genes hospedantes después de su incorporación al cromosoma hospedante, o no activen oncogenes. Además, si el gen viral se expresa de manera continua, incluso en niveles bajos para causar enfermedades autoinmunes, o si el vehículo viral causa infección viral modificada, los ASO no pueden ser administrados eficientemente.

Para superar estos problemas, se han estudiado procedimientos de fusión de un gen en el liposoma vehículo no viral o procedimientos de uso de lípidos o de polímeros catiónicos para superar sus deficiencias. Aunque estos vehículos no virales son menos eficientes que los vehículos virales, tienen la ventaja de que son seguros *in vivo*, causan menos efectos secundarios y pueden ser producidos a bajo coste (Lehrman S. Nature. 401(6753) :517-518, 1999).

Con el fin de lograr de manera efectiva la administración estable de moléculas de ODN, incluyendo un ASO usando vehículos no virales, se requiere un procedimiento eficaz para prevenir la degradación enzimática o no enzimática. Así, se han propuesto procedimientos de modificación química de los ASO para hacer que el AOS sean estables frente a la nucleasa y para aumentar la absorción intracelular de los AOS (Shigery Kawakami y Mitsuru Hashida. Drug Metab.Parmacokinet. 22(3): 142-151, 2007).

Sin embargo, los polímeros que comprenden PEG (polietilenglicol) forman compuestos que tienen estructuras micelas formadas espontáneamente mediante interacciones entre ellas, y estos compuestos se conocen como micelas compuestas de polímeros (Kataoka K. et al Macromoléculas, 29:8556-8557, 1996). Estas micelas compuestas de polímeros tienen ventajas en el hecho de que tienen un tamaño muy pequeño en comparación con otros sistemas de administración de fármacos, tales como microesferas o nanopartículas, mientras que su distribución es muy uniforme, y se forman espontáneamente, lo que facilita el control de la calidad de la formulación y garantiza la reproducibilidad.

En los últimos años, con el fin de aumentar la eficacia de la administración intracelular de las ASO, se ha desarrollado la tecnología de asegurar la estabilidad de los ASO y la permeación eficiente de los ASO a través de la membrana celular mediante la conjugación de un material hidrófilo, tal como el polímero biocompatible PEG, con los ASO mediante un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador (Registro de patente Coreana N° 0466254). Sin embargo, mejorar la estabilidad *in vivo* de los ASO y garantizar la administración eficiente de los ASO en el tejido diana es difícil de lograr solo mediante la modificación química y la PEGilación.

Tal como se ha descrito anteriormente, se desarrolló la tecnología SAMiRNA alrededor de nanopartículas obtenidas al introducir materiales hidrófobos e hidrófilos en el ARNsi para mejorar la administración intracelular del ARNsi, pero aún no se ha informado de la aplicación de esta tecnología a la administración de ASO. Por lo tanto, es necesario desarrollar un sistema de administración del ASO y un procedimiento de preparación del mismo mediante la introducción de varias modificaciones químicas en las ASO y la conjugación de varios polímeros a los ASO para proteger a los ASO de las enzimas con el fin de aumentar la estabilidad de los mismos y la permeación eficiente a través de la membrana celular.

60 **Divulgación de la invención**

La invención viene definida por las reivindicaciones. Cualquier otra divulgación se proporciona únicamente con fines de referencia. Cualquier referencia en la descripción a los procedimientos de tratamiento se refiere a los compuestos, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos de la presente invención para su uso en un procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.

En un primer aspecto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una estructura de fármaco terapéutica, que comprenda materiales hidrófilos e hidrófobos, que son compuestos poliméricos biocompatibles unidos a ambos extremos del fármaco terapéutico por medio de un enlace covalente simple o de un enlace covalente mediado por el unificador, para aumentar la eficacia de la administración intracelular del fármaco terapéutico, y, además, comprende un ligando definido unido al extremo del material hidrófilo, una nanopartícula compuesta por la estructura terapéutica del fármaco y un procedimiento de preparación del mismo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una estructura de oligo ARN de doble hélice que comprenda materiales poliméricos hidrófilos e hidrófobos biocompatibles, unidos a ambos extremos del oligo ARN de doble hélice por medio de un enlace simple o de un enlace covalente mediado por el enlazador, para aumentar la eficacia de la administración intracelular del oligo ARN de doble hélice y, además, comprende, unido al extremo del material hidrófilo, un ligando específico del receptor que tiene la propiedad de mejorar la internalización de la célula diana (en particular la célula cancerosa) por medio de endocitosis mediada por el receptor (RME); una nanopartícula compuesta por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unida al ligando; y una composición farmacéutica que comprende ya sea la estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando o una nanopartícula compuesta de las estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a ligando.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar procedimientos para preparar la estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando y una nanopartícula que comprende la misma, y una técnica para la administración de un oligo ARN de doble hélice usando la estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando.

Cuando un ligando específico de la diana se une a una estructura de oligo ARN de doble hélice, una nanopartícula compuesta por las estructuras de oligo ARN de doble hélice de ligando puede ser administrada de manera eficaz a la célula diana. Por lo tanto, incluso cuando la estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando se administra a una concentración relativamente baja, puede exhibir la actividad del oligo ARN de doble hélice en la célula diana. Además, debido a que el ligando puede prevenir la administración no específica del oligo ARN de doble hélice a otros órganos y células, la estructura del ARN de doble hélice unida a ligando puede usarse para el tratamiento de varias enfermedades y también puede usarse eficazmente como un nuevo tipo de sistema de administración de oligo ARN de doble hélice. En particular, la estructura de ARN de doble hélice unida a ligando se puede usar eficazmente para el tratamiento de enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades infecciosas.

Se describe además un conjugado polímero y ASO, que comprende materiales poliméricos hidrófilos e hidrófobos biocompatibles, unidos a ambos extremos del ASO por medio de un enlace covalente simple o de un enlace covalente mediado por enlazador para mejorar la eficacia de la administración intracelular del ASO, y un procedimiento de preparación de la misma.

Otro aspecto es proporcionar una técnica de administración de un ASO usando una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO, y una composición farmacéutica que comprende el conjugado de polímero y ASO o una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO.

El conjugado de polímero y ASO y una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO pueden aumentar la estabilidad *in vivo* del ASO, lo que permite administrar eficazmente el ASO terapéutico en las células. Además, pueden exhibir la actividad del ASO en concentraciones relativamente bajas en comparación con un ASO cuyo fin no fue modificado, incluso en ausencia de un agente de transfección. Por lo tanto, el conjugado de polímero y ASO y una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO pueden usarse para el tratamiento de diversas enfermedades, incluyendo cáncer y enfermedades infecciosas, y también pueden usarse muy eficazmente como un nuevo tipo de sistema de administración de ASO en la investigación básica de bioingeniería y en las industrias médicas.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es una vista esquemática de una nanopartícula (SAMIrNA) compuesta de estructuras de oligo ARN de doble hélice que tienen un ligando unido a ellas.

La FIG. 2 muestra la administración específica del tumor de SAMiRNA. La FIG. 2A es una fotografía que muestra la biodistribución del SAMiRNA con el tiempo después de que el SAMiRNA marcado con Cy5.5 se administrara una vez a la vena de cola de un ratón transplantado con un tumor, a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal (la porción indicada por la línea de puntos roja es una porción transplantada con un tumor). La FIG. 2(B) es una fotografía *ex vivo* de cada uno de los tejidos recogidos a las 48 horas después de la administración de SAMiRNA.

La FIG. 3 muestra los resultados del análisis de NMR de 1,3,4,6-tetraacetil-NAG (compuesto A). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆); δ7.89 ppm (1H, d, J=9,3 Hz), 5,64 ppm (1H, d, J=8,7 Hz), 5,27 ppm (1H, d, J=3,3 Hz), 5,07 ppm (1H, dd, J=11,7, 3,6 Hz), 4,22 ppm (1H, t, J=6,3 Hz), 4,14-3,96 ppm (2H, m), 2,12 ppm (3H, s), 2,04 ppm (3H, s), 1,99 ppm (3H, S), 1,91(3H, s), 1,78 ppm (3H, s).

La FIG. 4 muestra los resultados del análisis de NMR de 3,4,6-triacetil-1-hexa(etilenglicol)-N-acetilgalactosamina(NAG) (compuesto B). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-D₆); δ7.71 ppm (1H, D, J=9,3 Hz), 5,21

ppm (1H, d, J=3,0 Hz), 4,97 ppm (1H, dd, J=11,1, 3,0 Hz), 4,56 ppm (1H, D, J=8,7 Hz), 3,88 ppm (1H, q, J=8,7 Hz), 3,83-3,74ppm (1H, m), 3,62-3,39 ppm (25H, m), 2,10 ppm (3H, S), 2,01 ppm (3H, s), 1,89 ppm (3H, s), 1,77 ppm (3H, s).

La FIG. 5 muestra los resultados del análisis de NMR de 1-hexa(etilenglicol)-NAG-fosforamidita (compuesto C). A) ^1H NMR (300 MHz, DMSO- D_6); δ 7,78 ppm (1H, d, J=9,3 Hz), 5,21 ppm (1H, d, J=3,0 Hz), 4,97 ppm (1H, dd, J=11,1, 3,6 Hz), 4,56 ppm (1H, d, J=8,1 Hz), 3,88 ppm (1H, d, J=9,0 Hz), 3,81-3,41 ppm (30h, m), 2,89 ppm (2H, t, J=5,7 Hz), 2,11 ppm (3H, s), 2,00 ppm (3H, s), 1,89 ppm (3H, s), 1,77 ppm (3H, s), 1,20-1,12 ppm (12h, m), (B) ^{31}P datos NMR (121 MHz, DMSO- D_6); δ 147,32 ppm.

La FIG. 6 muestra un proceso de preparación de un ARN monocatenario.

La FIG. 7 muestra un proceso para la preparación de una estructura de oligo ARN de doble hélice que comprende PEG unida al extremo 5' de un oligo ARN de doble hélice y los resultados del análisis de la estructura de ARN. La FIG. 7(A) muestra un proceso de unión de PEG a un oligo ARN de doble hélice usando PEG-fosforamidita, La FIG. 7(B) muestra los resultados del análisis de MS MALDI-TOF de un ARN monocatenario (21mero) que no se modificó en el extremo 5' (SEQ ID NO: 1; MW 6662.1), y La FIG. 7(C) muestra los resultados de MALDI-TOF MS de un ARN monocatenario (21mero) con PEG unido al extremo 5' (SEQ ID NO: 1; MW 6662.1).

La FIG. 8 muestra un proceso para preparar una estructura mono-NAG-PEG-ARN y los resultados del análisis de la estructura. La FIG. 8(A) muestra un proceso de unión de *N*-acetil galactosamina (NAG) a PEG-ARN usando *N*-acetil galactosamina-fosforamidita, La FIG.8(B) muestra los resultados del análisis de MS MALDI-TOF de una estructura de NAG-PEG-ARN (azul, MW 9171.2) que comprende *N*-acetil galactosamina unida a PEG-ARN (verde, MW 8624.1) y muestra que el pico central fue desplazado por el peso molecular de *N*-acetil galactosamina (MW 547).

La FIG. 9 muestra un proceso para preparar una estructura de triple NAG-PEG-ARN y los resultados del análisis de la estructura. La FIG. 9(A) muestra un proceso de unión de *N*-acetil galactosamina a PEG-ARN usando dendrímero fosforamidita y NAG-fosforamidita, y la FIG.9 (B) muestra los resultados del análisis de MS MALDI-TOF de PEG-ARN (verde, M.W. 86241), y una estructura mono-NAG-PEG (azul, MW 9171.2) y una estructura triple-NAG-PEG-ARN (rojo, MW 10630), que comprende *N*-acetil galactosamina unida a ella.

La FIG. 10 muestra un proceso para preparar una estructura folato 5'-PEG-ARN y los resultados del análisis de la estructura. La FIG. 10(A) muestra un proceso de unión de folato a PEG-ARN por medio de NHS-folato, y la FIG. 10(B) muestra los resultados del análisis de MS MALDI-TOF de PEG-ARN (verde, MW 8624.1) y una estructura folato-PEG-ARN (azul, MW 9277.8) y muestra que el pico central es desplazado por el peso molecular del folato (MW 615).

La FIG. 11 muestra los resultados del análisis de una estructura de C_{24} 5'-ARN. La FIG. 11(A) muestra el análisis del MS MALDI-TOF de un ARN monocatenario complementario al SEQ ID NO: 1 (MW 7349.5), y la FIG. 11(B) muestra el análisis del MS MALDI-TOF de una estructura de C_{24} 5'-ARN complementaria al SEQ ID NO: 1 (MW 7830,2).

La FIG. 12 muestra un proceso de preparación de una estructura CPG 3'-amina-PEG-ARN por medio de amina-CPG.

La FIG. 13 muestra un proceso de preparación de una estructura CPG 3'-amina-PEG-ARN por medio de amina-CPG.

La FIG. 14 muestra un proceso de preparación de una estructura folato 3'-PEG-ARN y los resultados del análisis de la estructura. La FIG. 14(A) muestra un proceso de unión de folato a una estructura de amina 3' -PEG-ARN por medio de NHS-folato; y la FIG. 14(B) muestra los resultados del análisis de MS MALDI-TOF de una estructura folato 3'-PEG-ARN (SEQ ID NO: 1; MW 9277,7).

La FIG. 15 muestra los resultados del análisis de las propiedades físicas de una nanopartícula (folato-SAMiRNA) compuesta de estructuras folato 5'-ARN-polímero. La FIG. 15(A) es un diagrama gráfico que muestra el tamaño y el índice de polidispersión (PDI) del folato-SAMiRNA, y la FIG. 15(B) es un diagrama gráfico que muestra la concentración de micela crítica de folato-SAMiRNA.

La FIG. 16 muestra el efecto del folato-SAMiRNA en la inhibición de la expresión del gen diana en una línea celular que sobreexpresa el receptor folato. El nivel del gen diana mRNA en la línea celular tumoral KB que sobreexpresa el receptor de folato se midió mediante qPCR a las 48 horas después del tratamiento con folato-SAMiRNA y SAMiRNA. En la FIG. 16, sin folato en medio de cultivo: estado libre de folato; con folato en medio de cultivo: un estado que contiene una cantidad excesiva (1 mM) de folato; Con: Un grupo de prueba tratado con la nanopartícula SAMiRNA-Con compuesta de estructuras de polímero de oligo ARN de doble hélice que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 2 (secuencia de control); SAM: Grupo de prueba tratado con la nanopartícula SAMiRNA-Sur compuesta de estructuras de polímero de oligo ARN de doble hélice que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 (secuencia de supervivina); Folato-SAM: Un grupo de prueba tratado con la nanopartícula Folato-SAMiRNA-Sur compuesta de folato-oligo ARN de doble cadena que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 (secuencia de supervivina) y que tiene un ligando folato unido al mismo.

La FIG. 17 muestra el efecto del folato-SAMiRNA en la inhibición de la expresión del gen diana en el tejido tumoral. El nivel de ARNm del gen diana (supervivina) en el tejido tumoral se midió mediante qPCR a las 48 horas o las 72 horas después de cada una de SAMiRNA y folato-SAMiRNA se administró una vez a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal a la vena de cola de un ratón con un tumor compuesto de la línea celular tumoral KB que sobreexpresa el folato receptor48. En la FIG. 17, PBS: Control negativo; SAMiRNA: Grupo administrado con la nanopartícula SAMiRNA-Sur compuesta de estructuras de polímero de oligo ARN de

doble hélice que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 (secuencia survivina) y sin ligando u a ello; Folato-SAMiRNA: Un grupo administrado con la nanopartícula Folato-SAMiRNA-Sur de SEQ ID NO: 1 (secuencia de survivina) que tiene un ligando folato unido a ella.

La FIG. 18 es una visión esquemática de una nanopartícula que comprende un conjugado de polímero y ASO (referencial).

La FIG. 19 muestra el espectro MALDI-TOF MS de cada uno de un ASO y un conjugado de polímero y ASO de acuerdo con la presente invención. Cuatro nucleótidos en ambos extremos (3' y 5') se modifican con 2-OCH₃(metoxi), y 'm' indica un grupo de OCH₃ (metoxi). La FIG. 19(A) muestra los datos MALDI-TOF del ASO (M.W. 5967,9 da), y la FIG. 19(B) muestra los datos de MALDI-TOF del conjugado de polímero y ASO (M.W. 8448 da) (referencial).

La FIG. 20 muestra los resultados del análisis de las propiedades físicas de una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO. La FIG. 20(A) es un diagrama gráfico que muestra el tamaño y el índice de polidispersión (PDI) de una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO; y la FIG. 20(B) es un diagrama gráfico que muestra la concentración de micela crítica de la nanopartícula compuesta por conjugados de polímero y ASO (referencial).

La FIG. 21 muestra los resultados de analizar el nivel de expresión de ARNm a diversas concentraciones de tratamiento (10, 50 y 100 Nm) a fin de examinar los efectos de un ASO y un conjugado de polímero y ASO en la inhibición de la expresión del gen diana en las células tumorales. Scramble: Un ASO de SEQ ID NO: 4 (secuencia de control); Survivina: Un ASO de SEQ ID NO: 3 (secuencia de survivina); ASO: Un ASO sin material unido a él; conjugado de polímero y ASO: Un conjugado de polímero y ASO en forma de 3'PEG-ASO-5'lipídico) (referencial).

El mejor modo para llevar a cabo la invención

1. Primer aspecto de la presente invención

En el primer aspecto de la presente invención, el término "cadena antisentido" significa una cadena que muestra la actividad de ARNi para unir y degradar el ARNm diana en RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN), y el término "cadena de sentido" significa una cadena que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido.

Como se usa en este documento, los términos "complementario" o "enlace complementario" significan que dos secuencias se unen entre sí para formar una estructura de doble cadena. Incluye no solo una coincidencia perfecta entre dos secuencias, sino también una falta de coincidencia entre dos secuencias.

La presente invención proporciona una estructura de fármaco terapéutico-polímero que tiene una estructura de la fórmula siguiente (1) y que comprende un ligando unido a ella:



en donde A es un material hidrófilo; B es un material hidrófobo; X e Y son cada uno un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador, independiente el uno del otro; R es un oligo ARN de doble hélice; y L es un ligando específico del receptor que tiene la propiedad de mejorar la internalización de la célula diana por medio de endocitosis mediada por el receptor (RME), unida covalentemente al extremo del material hidrófilo, siendo dicho ligando seleccionado entre folato, N-acetilgalactosamina (NAG) y manosa.

Aquí, el fármaco terapéutico es un oligo ARN de doble hélice. El material hidrófilo puede estar unido a los extremos 3' o 5' del oligo ARN de doble hélice.

En la estructura fármaco terapéutico-polímero de la invención, que comprende un ligando unido a ella, un ligando puede además estar unido al extremo del material hidrófilo unido al oligo ARN de doble hélice. El ligando puede ser seleccionado entre folato (folato se usa indistintamente con ácido fólico, y el término "folato" como se usa aquí se refiere al folato que es activo en la naturaleza o en el cuerpo humano), N-acetilgalactosamina (NAG) y manosa, que tienen la propiedad de unirse específicamente al receptor que mejora la internalización de la célula diana por medio de RME.

El oligo ARN de doble hélice está compuesto preferentemente por 19-31 nucleótidos. El oligo ARN de doble hélice que se usa en la presente invención puede ser cualquier oligo ARN de doble hélice para cualquier gen que se usa o puede usarse para terapia génica o en investigación.

El material hidrófobo funciona para formar por interacción hidrófoba una nanopartícula compuesta de estructuras de oligo ARN de doble hélice. Entre los materiales hidrófobos, una cadena de carbono o un colesterol son muy adecuados para su uso en la preparación de la estructura de la presente invención, porque pueden ser fácilmente unidos en el paso de sintetizar los oligo RNA de doble hélice.

El material hidrófobo tiene preferentemente un peso molecular de 250-1.000. Particularmente, el material hidrófobo que se usa en la presente invención puede ser un derivado esteroide, un derivado de glicérido, éter de glicerol, glicol

de polipropileno, hidrocarburo C₁₂-C₅₀ insaturado o saturado, diacil fosfatidilcolina, ácido graso, fosfolípido, lipopolamina o similares, pero no está limitado a ello, y será obvio para aquellos expertos en la técnica que se puede usar cualquier material hidrófobo adecuado para los fines de la presente invención.

5 En particular, el derivado esteroide puede ser seleccionado del grupo que consiste en colesterol, colestanol, ácido cólico, formato de colesterilo, formato de colestanoilo y colestanoil amina, y el derivado de glicérido puede ser seleccionado entre los mono-, di- y tri-glicéridos, en donde el ácido graso del glicérido puede ser un ácido graso C₁₂-C₅₀ insaturado o saturado.

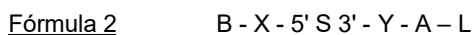
10 Además, el material hidrófilo es preferentemente un polímero catiónico o no iónico con un peso molecular de 200-10.000, y más preferentemente un polímero no iónico con un peso molecular de 1.000-2.000. Por ejemplo, el material hidrófilo que se usa en la presente invención es preferentemente un compuesto de polímero hidrófilo no-iónico tal como polietilenglicol, polivinil pirrolidona o polioxazolina, pero no está limitado a ello.

15 El material hidrófilo puede, si es necesario, ser modificado para tener un grupo funcional necesario para la unión al ligando. Entre los materiales hidrófilos, particularmente el polietilenglicol (PEG) puede tener varios pesos moleculares y grupos funcionales, tiene buena biocompatibilidad, no induce respuesta inmune, aumenta la estabilidad *in vivo* del oligo ARN de doble hélice, y aumenta la eficiencia de la administración del ARN, y por lo tanto es muy adecuado para la preparación de la estructura del oligo ARN de doble hélice de la invención.

20 El enlazador que media el enlace covalente no está específicamente limitado, siempre y cuando forme un enlace covalente entre el material hidrófilo (o el material hidrófobo) y el extremo del oligo ARN de doble hélice y proporcione una unión que, si es necesario, puede degradarse en un ambiente específico. Por lo tanto, el enlazador puede incluir cualquier compuesto que una el material hidrófilo (o el material hidrófobo) al oligo ARN de doble hélice durante el proceso de preparación de la estructura.

25 Además, el enlace covalente puede ser un enlace no degradable o un enlace degradable. En este caso, los enlaces no degradables incluyen, pero no se limitan a, un enlace de amida o un enlace de fosfato, y los enlaces degradables incluyen, pero no se limitan a, un enlace de disulfuro, un enlace degradable de ácido, un enlace de éster, un enlace de anhídrido, un enlace biodegradable o un enlace biodegradable enzimáticamente.

30 La presente invención proporciona una estructura de oligo ARN de doble hélice conjugada a ligando representada por la fórmula siguiente (2), que comprende un material hidrófilo unido al extremo 3' de la cadena de sentido de un oligo ARN de doble hélice, un ligando unido al material hidrófilo y un material hidrófobo unido al extremo 5' de la cadena sentido:



35 En donde A es el material hidrófilo; B es el material hidrófobo; X e Y son cada uno de manera independiente un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador; S es la cadena de sentido del oligo ARN de doble hélice; AS es la cadena antisentido del oligo ARN de doble hélice; y L es el ligando específico del receptor que tiene la propiedad de mejorar la internalización de la célula diana por endocitosis mediada por el receptor (RME).

40 Un procedimiento para preparar la estructura de oligo ARN de doble hélice conjugada con ligando representada por la fórmula (2) comprende los pasos de:

- 45
- (1) sintetizar un ARN monocatenario en un soporte sólido que tenga un material hidrófilo de grupo funcional unido al mismo;
 - 50 (2) unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 5' del ARN monocatenario que tiene el material hidrófilo del grupo funcional unido al mismo;
 - (4) separar la estructura de grupo funcional-ARN-polímero y un ARN monocatenario complementario sintetizado por separado del soporte sólido;
 - (5) unir covalentemente un ligando al extremo del material hidrófilo por medio del grupo funcional; y
 - 55 (6) hibridar la estructura de polímero-ARN unido al ligando con el ARN monocatenario complementario para formar una estructura de ARN bicatenario, en la que el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos para la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos para el receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).

60 En una forma de realización más preferente de la presente invención, el procedimiento puede comprender los pasos de: (1) unir un material hidrófilo a un soporte sólido (CPG) que tenga un grupo funcional unido a él; (2) sintetizar un ARN monocatenario sobre el soporte sólido (CPG) que tenga el material hidrófilo del grupo funcional unido a él; (3) unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 5' del ARN monocatenario; (4) separar la estructura de grupo funcional-ARN-polímero y un ARN monocatenario complementario sintetizado por separado del soporte sólido (CPG); (5) unión covalente de un ligando al extremo del material hidrófilo por medio del grupo funcional para preparar una estructura de ARN-polímero que tenga el ligando estructurado encima; y (6) hibridar la estructura de ARN unido al ligando-polímero con el ARN monocatenario complementario para formar una estructura de oligo ARN de doble hélice

que tiene el ligando unido a ella, en donde el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos para la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos para el receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME). Después del paso (6), la estructura ARN-polímero y el ARN monocatenario complementario pueden separarse y purificarse de los reactivos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y a continuación el peso molecular puede medirse mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF para determinar si se prepararon la estructura ARN-polímero y el ARN deseados. En el procedimiento de preparación descrito anteriormente, el paso de sintetizar el ARN monocatenario complementario al ARN monocatenario sintetizado en el paso (3) puede realizarse antes del paso (1) o en cualquiera de los pasos (1) a (6).

5
10 En otra forma de realización, la presente invención proporciona una estructura de oligo ARN de doble hélice unido a ligando, representada por la fórmula siguiente (3), que comprende un material hidrófilo unido al extremo 5' de la cadena sentido de un oligo ARN de doble hélice, un ligando unido al material hidrófilo y un material hidrófobo unido al extremo 3' de la cadena sentido:

15 Fórmula 3 L - A - X - 5' S 3' - Y - B 3' AS 5'

Un procedimiento para preparar la estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando representada por fórmula (3) comprende los pasos de:

20 (1) sintetizar un ARN monocatenario sobre un soporte sólido que tenga un grupo funcional unido a él;
(2) unir covalentemente un material hidrófilo al material obtenido en el paso (1);
(3) uniendo covalentemente un ligando al material obtenido en el paso (2), en donde el ligando está unido al extremo del material hidrófilo;
(4) separar del soporte sólido el material obtenido en el paso (3);
25 (5) unir covalentemente un material hidrófobo al material resultante del paso (4) por medio del grupo funcional unido al extremo 3'; y.
(6) hibridar el material resultante del paso (5) con un ARN monocatenario complementario para formar una estructura de ARN de doble cadena, en donde el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos de la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos del receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).
30

En una forma de realización más preferida, el procedimiento de preparación puede comprender los pasos de: (1) sintetizar un ARN monocatenario sobre un soporte sólido (GPC) que tenga un grupo funcional unido a él; (2) unir covalentemente un material hidrófilo al extremo 5' del ARN monocatenario; (3) unir covalentemente un ligando al extremo del material hidrófilo unido al ARN monocatenario para sintetizar una estructura de grupo funcional-ARN-polímero hidrófilo; (4) separar del soporte sólido (CPG) la estructura de grupo funcional-ARN-polímero hidrófilo; (5) unir un material hidrófobo al ARN a través del grupo funcional para sintetizar una estructura ARN-polímero que tenga un ligando unido a él; y (6) hibridar la estructura preparada de ARN-polímero con un ARN monocatenario complementario para preparar una estructura de polímero-oligo ARN de doble hélice, en la que el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos para la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos del receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).
35
40

Después del paso (5), el ARN se puede separar y purificar de los reactivos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), y después se puede medir el peso molecular mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF para determinar si se prepararon la estructura ARN-polímero y el ARN deseados. En el procedimiento de preparación descrito anteriormente, el paso de sintetizar el ARN monocatenario complementario al ARN monocatenario sintetizado en el paso (1) puede realizarse antes del paso (1) o en cualquiera de los pasos (1) a (6).
45

En otra forma de realización, la presente invención proporciona una estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando representada por la fórmula siguiente (4), que comprende un material hidrófilo o hidrófobo unido al extremo 5' de la cadena de sentido y la cadena antisentido de un ARN de doble hélice :
50

Fórmula (4) L - A - X - 5' S 3' 3' AS 5' - y - B

55 en donde A es un material hidrófilo; B es un material hidrófobo; X e Y son cada uno de manera independiente un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador; S es la cadena sentido de un oligo ARN de doble hélice; AS es la cadena antisentido del oligo ARN de doble hélice; y L es un ligando específico del receptor que tiene la propiedad de mejorar la internalización de la célula diana por endocitosis mediada por el receptor (RME).

Un procedimiento para preparar la estructura de oligo ARN de doble hélice representada por la fórmula (4) comprende los pasos de:
60

(1) sintetizar un ARN monocatenario sobre un soporte sólido;
(2) unir covalentemente un material hidrófilo al extremo 5' del ARN monocatenario;
65 (3) unir covalentemente un ligando al extremo del material hidrófilo unido al ARN monocatenario;

(4) separar del soporte sólido la estructura de polímero hidrófilo-ARN unido a ligando y una estructura de polímero hidrófobo-ARN complementaria, sintetizada por separado; y

1. (5) hibridar la estructura de polímero hidrófilo-ARN unido a ligando a la estructura de polímero hidrófobo-ARN complementario para formar una estructura de doble cadena, en la que el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos para la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos del receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).

El procedimiento de preparación comprende, entre los pasos (1) a (4), un paso de sintetizar un ARN monocatenario complementario al ARN monocatenario del paso (1), y después unir covalentemente un material hidrófobo al ARN monocatenario sintetizado para sintetizar una de polímero hidrófobo-ARN unido a ligando .

La presente invención también proporciona una nanopartícula que comprende la estructura de oligo ARN de doble hélice que tiene el ligando unida a ella, y una nanopartícula que comprende la estructura de fármaco terapéutico-polímero que tiene el ligando unido a ella.

Una nanopartícula se forma por medio de la interacción entre las estructuras de oligo ARN de doble hélice unidas a ligando de la presente invención. Específicamente, se forma una nanopartícula, que tiene una estructura en la que un material hidrófobo se encuentra en el centro de la nanopartícula, un oligo ARN de doble hélice está protegido por un material hidrófilo externo y un ligando se encuentra situado en la superficie de la nanopartícula (véase la FIG. 1). La nanopartícula administra el oligo ARN de doble hélice a una célula por medio del ligando, y de esta manera administra con mayor eficiencia el ARN a una célula. Esta nanopartícula puede usarse para el tratamiento de enfermedades. La síntesis de la estructura y las características, la eficiencia de la administración intracelular y los efectos de una nanopartícula que comprende la estructura se describirán con más detalle en los ejemplos siguientes.

Se describe, además, un procedimiento de terapia génica que usa una nanopartícula compuesta por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unido al ligando o las estructuras de fármaco terapéutico-polímero unidas a ligando.

De manera específica se describe un procedimiento terapéutico que comprende los pasos de: Preparar una nanopartícula compuesta por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a ligando; e introducir la nanopartícula en el cuerpo de un animal.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una nanopartícula compuesta de estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a ligando.

Para la administración, la composición de la presente invención puede comprender, además del principio activo descrito anteriormente, por lo menos un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable que puede usarse en la presente invención debe ser compatible con el principio activo de la presente invención y puede ser solución salina fisiológica, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol o una mezcla de dos o más de ellos. Además, la composición de la presente invención puede, si es necesario, comprender otros aditivos convencionales, incluyendo antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos. Además, la composición de la presente invención puede ser formulada como formas inyectables tales como soluciones acuosas, suspensiones o emulsiones con la ayuda de diluyentes, dispersantes, surfactantes, aglutinantes y lubricantes. En particular, la composición de la presente invención se proporciona preferentemente como una formulación liofilizada. Para la preparación de formulaciones liofilizadas, se puede usar cualquier procedimiento convencional conocido en la técnica, y también se puede añadir un estabilizador para la liofilización.

Además, la composición de la presente invención puede ser formulada en formas de dosificación adecuadas, dependiendo del tipo de enfermedad o del componente, de acuerdo a un procedimiento conocido en la técnica o el procedimiento descrito en Remington's Pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA).

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención puede ser determinada por aquellos expertos en la técnica dependiendo de las condiciones del paciente y de la gravedad de la enfermedad. Además, la composición de la presente invención puede ser formulada en forma de polvos, comprimidos, cápsulas, líquido, soluciones de inyección, ungüentos y jarabes, y se puede proporcionar en forma de dosis unitarias o múltiples formas de dosificación, por ejemplo, ampollas o viales sellados.

La composición farmacéutica de la presente invención puede ser administrada por vía oral o parenteral. La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede ser administrada por varias rutas, incluyendo, pero no limitado a, oral, intravenoso, intramuscular, intraarterial, intramedular, intradural, intracardal, transdérmico, subcutáneo, vías intraperitoneales, gastrointestinales, sublinguales y locales.

Para tal administración clínica, la composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en formas adecuadas usando técnicas conocidas en la técnica. La dosis de la composición de la presente invención puede variar dependiendo de varios factores, tales como el peso corporal de un paciente, la edad, el sexo, el estado de salud y la

dieta, el tiempo y el procedimiento de administración, la tasa de eliminación y severidad de la enfermedad, y fácilmente lo puede determinar una persona de habilidad ordinaria en la técnica.

Más adelante se describe un conjugado de polímero y ASO representado por la siguiente fórmula 5:

5

Fórmula 5

A-X-R-Y-B

en donde uno de A y B es un material hidrófilo, el otro es un material hidrófobo, X e Y son cada uno de manera independiente un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador, y R es un ASO.

10

Tal como se usa en este documento, el término "ASO" tiene por objeto incluir no solo los oligonucleótidos antisentido convencionales, que se usan para inhibir la expresión de ARNm, sino también los antagonistas que inhiben las funciones del ARNm.

15

El material hidrófilo de la fórmula (5) puede tener un ligando específico de la diana unido a él. El ligando específico de la diana tiene la propiedad de mejorar la internalización específica de la diana por endocitosis mediada por el receptor (RME) y puede seleccionarse entre anticuerpos específicos de la diana o aptámeros, péptidos como ligandos específicos del receptor y materiales químicos tales como folato, N-acetilgalactosamina (NAG) y manosa. En este caso, el resto focalizante es un material que realiza la administración de una manera específica de la diana y no se limita sólo a los anticuerpos, al aptámero, al péptido y a los materiales químicos descritos anteriormente.

20

En el conjugado, el ASO comprende preferentemente 10-50 oligonucleótidos, más preferentemente 13-25 oligonucleótidos.

25

Para mejorarla estabilidad *in vivo*, el ASO incluye oligodesoxinucleótidos (ODN) obtenidos por diversas modificaciones que proporcionan resistencia a la nucleasa. La modificación puede ser una o una combinación de dos o más seleccionados entre la sustitución de un grupo -OH en la posición 2' del carbono del resto del azúcar de uno o más nucleótidos con -CH₃(metilo), -OCH₃, -NH₂, -F (flúor), -O-2-metoxietilo, -O-propil, -O-2-metilietilo, -O-3-aminopropilo, -O-3-dimetilaminopropilo, -O-N-metilacetamido o -O-dimetilamidoxietilo; la sustitución del oxígeno del resto de azúcar del nucleótido con azufre; la modificación del enlace entre los nucleótidos en un enlace de fosforotioato, boranofosfato o fosfonato de metilo. Alternativamente, la modificación puede ser la modificación en forma de PNA (ácido nucleico peptídico) o LNA (ácido nucleico bloqueado).

30

35

Un ASO que puede usarse no está específicamente limitado y puede ser un ASO para cualquier gen que se usa o que puede usarse para terapia génica o en investigación.

40

Será obvio para aquellos expertos en la técnica que los ASO que se usan incluyen no solo un ASO que tiene una coincidencia perfecta con el mRNA diana, sino también un ASO que no coincide con el mRNA diana para inhibir la traducción del mRNA.

El material hidrófilo tiene preferentemente un peso molecular de 200-10.000, más preferentemente de 1.000-2.000. Además, el material hidrófilo es preferentemente un compuesto de polímero catiónico o no iónico.

45

Por ejemplo, el compuesto polimérico hidrófilo que se usa es preferentemente un compuesto polimérico no iónico hidrófilo tal como PEG (polietileno), polivinilpirrolidona o polioxazolina, pero no se limita a estos.

50

Si es necesario, el material hidrófilo puede ser modificado para que tenga un grupo funcional necesario para la unión a otros materiales. Entre los materiales hidrófilos, en particular el polietilenglicol (PEG) puede tener varios pesos moleculares y grupos funcionales, tiene una buena biocompatibilidad, no induce respuesta inmune, incrementa la estabilidad *in vivo* del ASO y aumenta la eficiencia de la administración del ASO, y por lo tanto es muy adecuado para la preparación del conjugado de la invención.

55

Además, el material hidrófobo tiene preferentemente un peso molecular de 250-1.000. En particular, el material hidrófobo que se usa puede ser preferentemente un derivado esteroide, un derivado de glicerido, éter de glicerol, glicol de polipropileno, a hidrocarburo C₁₂-C₅₀ insaturado o saturado, diacil fosfatidilcolina, ácido graso, fosfolípido, lipopolamina o similares, pero no está limitado a estos, y será obvio para aquellos expertos en la técnica que puede usarse cualquier material hidrófobo que sea adecuado para los fines de la presente invención.

60

Particularmente, el derivado esteroide puede ser seleccionado del grupo que consiste en colesterol, colestanol, ácido cólico, formato de colesterilo, formato de colestanoil y amina del colestanoil, y el derivado del glicérido pueden ser seleccionados entre los mono-, di- y tri-gliceridos, en donde el ácido graso del glicérido puede ser un ácido graso C₁₂-C₅₀ insaturado o saturado.

65

El material hidrófobo actúa para causar una interacción hidrófoba con objeto de formar una nanopartícula. Entre los materiales hidrófobos, particularmente una cadena de carbono o un colesterol son muy adecuados para la preparación del conjugado de la presente invención, porque pueden ser fácilmente unidos en el paso de preparar un ASO.

Además, el enlace covalente indicado por X o Y en la fórmula 5 puede ser un enlace no degradable o degradable. En este caso, los enlaces no degradables incluyen, pero no se limitan a, un enlace de amida o un enlace de fosfato, y los enlaces degradables incluyen, pero no se limitan a, un enlace de disulfuro, un enlace degradable de ácido, un enlace de éster, un enlace de anhídrido, un enlace biodegradable o un enlace biodegradable enzimáticamente.

Un conjugado de polímero y ASO puede tener una estructura en la que un material hidrófilo está unido a uno de los extremos 5' y 3' de un ASO y un material hidrófobo está unido al otro extremo

Un procedimiento para preparar el conjugado de polímero y ASO que tenga el material hidrófilo unido al extremo 3' del ASO puede estar compuesto por los siguientes pasos:

- a) unir covalentemente un material hidrófilo a un soporte sólido;
- b) sintetizar un ASO sobre el soporte sólido que comprende el material hidrófilo;
- c) unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 5' del ASO sobre el soporte sólido; y
- d) separar del soporte sólido y purificar el conjugado de polímero y ASO resultante.

En una variante más preferente, el conjugado de polímero y ASO se prepara mediante un procedimiento que comprende los pasos de: Unir covalentemente un material hidrófilo a un soporte sólido (vidrio mineral controlado (CPG)); sintetizar un ASO sobre el soporte sólido (CPG), que tiene el material hidrófilo covalentemente unido a él, desbloqueando, acoplado, añadiendo una caperuza (capping) y oxidando; y unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 5' del ASO. Una vez finalizada la preparación del conjugado de polímero y ASO, el conjugado de polímero y ASO se separa del soporte sólido (CPG) tratándolo con un 60 % (v/v) de amoníaco en un baño de agua a 28 °C. Además, el conjugado de polímero y ASO puede separarse y purificarse de los reactivos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tras lo cual el peso molecular puede medirse mediante el espectrómetro de masas MALDI-TOF para determinar si se preparó el conjugado de polímero y ASO deseado.

En otra variante, un procedimiento para preparar un conjugado de polímero y ASO que comprende un material hidrófilo unido al extremo 5' de un ASO, comprende los pasos de:

- a) sintetizar un ASO sobre un soporte sólido que tenga un grupo funcional unido a ella;
- b) unir covalentemente un material hidrófilo al extremo 5' del ASO;
- c) separar del soporte sólido el conjugado de ASO unido al material hidrófilo; y
- d) unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 3' del ASO separado del soporte sólido.

El procedimiento de preparación puede comprender los pasos de: Sintetizar un ASO sobre un soporte sólido (GPC) que tenga un grupo funcional unido a él; unir covalentemente un material hidrófilo al extremo 5' del ASO; tratar el soporte sólido resultante con amoníaco al 28 % (v/v) en un baño de agua a 60 °C para separar del soporte sólido (CPG) el conjugado de polímero hidrófilo-ASO acoplado al grupo funcional; y unir un material hidrófobo al ASO a través del grupo funcional para formar un conjugado de polímero y ASO que comprende el material hidrófilo y el material hidrófobo fijado a ambos extremos del ASO. Una vez finalizada la preparación del conjugado de polímero y ASO, el conjugado de polímero y ASO puede separarse y purificarse de los reactivos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), tras lo cual el espectrómetro de masas MALDI-TOF puede medir el peso molecular para determinar si se preparó el conjugado de polímero y ASO deseado.

Sin embargo, el conjugado de polímero y ASO puede comprender, además, un ligando unido al material hidrófilo.

Un procedimiento de unión de un ligando al material hidrófilo se determina de acuerdo con el tipo de grupo funcional que se une al ligando. Por ejemplo, un ligando-fosforamidita que tenga fosforamidita como grupo funcional puede ser unido al material hidrófilo de la misma manera que en el proceso de síntesis del ASO, y un ligando que tenga N-hidroxisuccinimida (NHS) unido al mismo puede ser unido al material hidrófilo por medio de un enlace de éster de N-hidroxisuccinimida (NHS).

Un procedimiento para preparar un conjugado de polímero y ASO que comprende un ligando fijado a un conjugado de polímero y ASO que tiene un material hidrófilo unido al extremo 3' de un ASO, comprende los pasos de:

- a) unir un material hidrófilo a un soporte sólido que tenga un grupo funcional acoplado al mismo;
- b) sintetizar un ASO sobre el soporte sólido que tenga el material hidrófilo del grupo funcional unido al mismo;
- c) uniendo covalentemente un material hidrófobo al extremo 5' del ASO;
- d) separar del soporte sólido un conjugado de polímero y ASO, obtenido en el paso c); y
- e) unir un ligando al material hidrófilo del conjugado de polímero y ASO separado del soporte sólido.

En una variante más preferida, el procedimiento de preparación comprende los pasos de: Unir un polímero hidrófilo a un soporte sólido que tenga un grupo funcional unido a él; sintetizar un ASO sobre el soporte sólido (CPG) que tenga el material hidrófilo del grupo funcional unido a él; unir covalentemente un material hidrófobo al grupo final del ASO; separar del soporte sólido (CPG) el conjugado de funcional grupo-ASO-polímero resultante; y unir un ligando al

extremo del polímero hidrófilo por medio del grupo funcional, preparando así un conjugado de polímero y ASO unido a ligando. Una vez finalizada la preparación del conjugado de polímero y ASO unido a ligando, el conjugado de polímero y ASO puede separarse y purificarse de los reactivos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tras lo cual el espectrómetro de masas MALDI-TOF puede medir el peso molecular para determinar si se preparó el conjugado de polímero y ASO unido a ligando deseado.

En otra variante, un procedimiento para preparar un conjugado de polímero y ASO que comprende un ligando unido a un conjugado de polímero y ASO que tiene un material hidrófilo conectado al extremo 5' de un ASO, comprende los pasos de:

- a) sintetizar un ASO sobre un soporte sólido que tenga un grupo funcional adjunto al mismo;
- b) unir covalentemente un material hidrófilo al extremo del ASO;
- c) unir covalentemente un ligando al conjugado de material hidrófilo y ASO;
- d) separar del soporte sólido un conjugado de ASO-material hidrófilo-ligando, que tenga acoplado el grupo funcional; y,
- e) unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 3' del ASO del conjugado separado del conjugado sólido.

En una variante más preferida, el procedimiento de preparación comprende los pasos de: Sintetizar una ASO en un soporte sólido (GPC) que tenga un grupo funcional unido al mismo; unir covalentemente un material hidrófilo al grupo final del ASO; unir covalentemente un ligando al polímero hidrófilo-ASO; separar del soporte sólido (CPG) el conjugado de ASO unido al grupo funcional-polímero hidrófilo-ligando; y fijar un material hidrófobo al conjugado separado por medio del grupo funcional, sintetizando de este modo un conjugado de polímero y ASO unido a ligando que tiene el material hidrófobo fijado al extremo opuesto al polímero hidrófilo. Una vez finalizada la preparación del conjugado de polímero y ASO unido a ligando, el conjugado de polímero y ASO puede separarse y purificarse de los reactivos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), tras lo cual el espectrómetro de masas MALDI-TOF puede medir el peso molecular para determinar si se preparó el conjugado de polímero y ASO unido a ligando deseado.

Como resultado, el conjugado de polímero y ASO sintetizado comprende tanto materiales hidrófobos como hidrófilos, y por lo tanto es de naturaleza anfílica. El resto hidrófilo tiende a salir por medio de la interacción (tal como un enlace de hidrógeno) con moléculas de agua *in vivo*, y el material hidrófobo tiende a entrar por medio de la interacción hidrófoba y, por lo tanto, se forma una nanopartícula termodinámicamente estable. En otras palabras, se forma una nanopartícula en la que el material hidrófobo se encuentra en el centro de la nanopartícula y el material hidrófilo se encuentra fuera del ASO para proteger el ASO (véase la FIG. 18). La nanopartícula formada tal como se ha descrito anteriormente, mejora la administración intracelular del ASO y puede usarse para el tratamiento de enfermedades. La síntesis del conjugado y las características, la eficacia de la administración intracelular y los efectos del conjugado se describirán con más detalle en los ejemplos siguientes.

Se describe un procedimiento de terapia génica que comprende los pasos de: Preparar una nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO; y administrar el ASO *in vitro* por parte de la nanopartícula. El procedimiento de terapia génica no se limita únicamente a la aplicación *in vitro*.

Se describe una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente efectiva del conjugado de polímero y ASO o una nanopartícula compuesta del conjugado de polímero y ASO unido a ligando.

Para la administración, la composición descrita anteriormente puede incluir, además del principio activo descrito anteriormente, al menos un vehículo farmacológicamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable que puede usarse tal como se ha descrito anteriormente debe ser compatible con el principio activo tal como se ha descrito arriba y puede ser solución salina fisiológica, agua estéril, solución de Ringer, solución salina tamponada, solución de dextrosa, solución de maltodextrina, glicerol, etanol o una mezcla de dos o más de ellos. Además, si es necesario la composición de la presente invención puede, comprender otros aditivos convencionales, incluyendo antioxidantes, tampones y agentes bacteriostáticos. Además, la composición descrita anteriormente se puede formular como formas inyectables tales como soluciones acuosas, suspensiones o emulsiones, con la ayuda de diluyentes, dispersantes, agentes tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. En particular, la composición descrita anteriormente se proporciona de manera preferente como formulación liofilizada. Para la preparación de formulaciones liofilizadas, se puede usar cualquier procedimiento convencional conocido en la técnica, y también se puede añadir un estabilizador para la liofilización.

Además, la composición descrita anteriormente puede formularse en formas de dosificación adecuadas, dependiendo del tipo de enfermedad o del componente, según un procedimiento conocido en la técnica o el procedimiento descrito en Remington's pharmaceutical Science (Mack Publishing Company, Easton PA).

La dosis de la composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente puede ser determinada por los expertos en la técnica dependiendo de las condiciones del paciente y fr la gravedad de la enfermedad. Además, la composición descrita anteriormente se puede formular en forma de polvos, comprimidos, cápsulas, líquido, soluciones de inyección,

ungüentos y jarabes, y se pueden proporcionar en formas de dosis unitarias o en formas de dosificación múltiple, por ejemplo, ampollas o viales sellados.

La composición farmacéutica descrita anteriormente puede administrarse por vía oral o parenteral. La composición farmacéutica descrita anteriormente puede ser administrada por varias vías, incluyendo, pero sin estar limitada a, las vías oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intramural, intracardiaca, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, gastrointestinal, sublingual y rutas locales. La dosis de la composición descrita anteriormente puede variar en función de diversos factores, como son el peso corporal del paciente, la edad, el sexo, el estado de salud y la dieta, el tiempo y el procedimiento de administración, la tasa de eliminación y la gravedad de la enfermedad, y una persona de habilidad ordinaria en la técnica lo puede determinar de manera sencilla.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención será descrita con más detalle con referencia a los ejemplos.

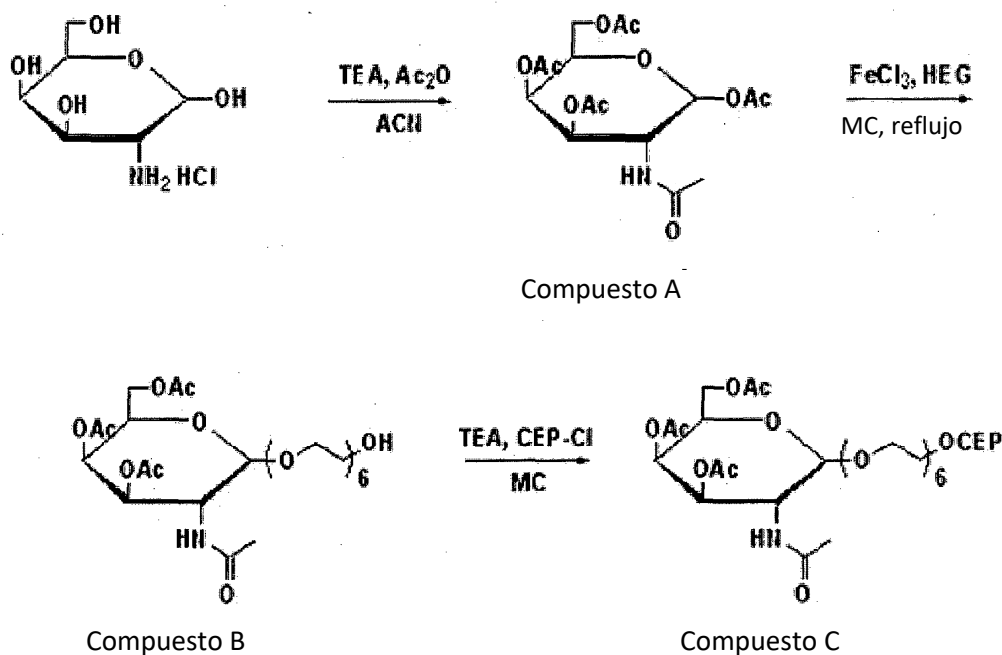
Ejemplo 1: Preparación de material de ligando que se puede unir

Con el fin de preparar una estructura de oligo ARN de doble hélice con un ligando unido a ella, se preparó un material de ligando que puede ser unido a la estructura de oligo ARN de doble hélice.

Ejemplo 1-1: Preparación del reactivo 1-hexa(etilenglicol)-N-acetil galactosamina-fosforamidita (compuestos A, B y C)

Con objeto de unir N-acetil galactosamina (NAG) a una estructura de oligo ARN de doble hélice, se preparó 1-hexa(etilenglicol)-NAG-fosforamidita como se muestra en el siguiente esquema de reacción 1.

Esquema de reacción 1



Ejemplo 1-1-1: Preparación de 1,3,4,6-tetraacetil-NAG (compuesto A)

El material de partida clorhidrato de galactosamina (Sigma Aldrich, EE.UU.) (2 g, 9,27 mmol), acetonitrilo (Samjeon, Corea) (31 ml) y trietilamina (Sigma Aldrich, EE.UU.) (15,42 ml, 111,24 mmol) se mezclaron entre sí y se sometieron a reflujo durante 1 hora. La mezcla se enfrió lentamente hasta la temperatura ambiente y se enfrió a 0 °C con agua helada, y después se añadió gota a gota anhídrido acético (Sigma Aldrich, EE.UU.) (8,76 ml, 92,70 mmol) por espacio de 10 minutos. A continuación, se eliminó el agua helada y se agitó el material restante a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras la finalización de la reacción, se añadió lentamente una solución acuosa de bicarbonato sódico (Samjeon, Corea) al producto de reacción hasta que el pH alcanzó el valor neutro. Después de que el pH alcanzara el valor neutro, se agitó la solución de reacción a temperatura ambiente durante 2 horas y se filtró el sólido producido. El filtrado se lavó secuencialmente con acetato de etilo (Samjeon, Corea) (100 ml × 2), agua destilada (100 ml × 2) y

de sustitución del grupo funcional amina del compuesto peptídico por un grupo protector . El grupo amino del compuesto peptídico fue sustituido por un grupo protector de 9-fluorenilo metiloxycarbonil (Fmoc) o tert-butiloxycarbonil (t-BOC) para eliminar su reactividad con el ácido carboxílico del péptido, preparando así un compuesto peptídico capaz de unirse a PEG.

5 Ejemplo 2: Preparación de la estructura de oligo ARN de doble hélice que tiene un ligando unido al extremo 5'

10 El material de ligando preparado en el ejemplo 1 puede construirse en forma de fosforamidita, tal como la NAG-fosforamidita del ejemplo 1-1, para que pueda ser unido al extremo del PEG mediante un proceso general de síntesis química de oligo (consistente en desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación). Alternativamente, puede construirse en la forma de un ligando NHS, tal como el folato NHS del ejemplo 1-2, para que pueda ser enlazado a PEG unido a amino por medio de un enlace de éster, sintetizando así una estructura de PEG-ARN que tiene el ligando unido al extremo 5' del ARN. La estructura sintetizada de PEG-ARN que tenía el ligando unido al extremo 5' fue hibridado con una estructura complementaria de ARN 5' C₂₄ 24' C que tenía un grupo hidrófobo unido a él, sintetizando así una estructura de oligo ARN de doble hélice que tenía el ligando enlazado al extremo 5'.

15 Ejemplo 2-1: Preparación de oligo ARN de doble hélice

20 En los siguientes ejemplos, se usó un oligo ARN de doble hélice contra survivina para inhibir la survivina. La survivina es una proteína que se expresa comúnmente en la mayoría de los tumores o de las líneas de células mutantes probadas hasta la fecha y se espera que sea una diana importante en la terapia contra el cáncer (Survivin: a new target for anti-cancer therapy. Cancer Treat Rev. 2009 Nov; 35(7):553-62). El oligo ARN de doble hélice de survivina de acuerdo con la presente invención consiste en una cadena sentido establecida en el SEQ ID NO: 1 y una cadena antisentido complementaria a la misma, y un nucleótido de oligos de doble cadena que se usa como control consiste en una cadena de sentido establecida en el SEQ ID NO: 2 y una cadena antisentido complementaria de la anterior. El oligo ARN de doble hélice usado en este ejemplo consiste en la siguiente secuencia de nucleótidos.

(N.O DE ID DE SEQ: 1) 5'-AAG GAG AUC AAC AUU UUC A-3'
 (N.O DE ID DE SEQ: 2) 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG A-3'

30 Con el fin de sintetizar el oligo ARN de doble hélice, el ARN monocatenario fue sintetizado enlazando los nucleótidos por medio de los enlaces fosfodiéster del esqueleto del ARN usando tert-butildimetilsililo-prottegido β-cianoetil fosforamidita (Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII: use of β-cyanoethyl-N,N-dialkylamino-/N-morpholino phosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. Nucleic Acids Res. 1984 Jun 11; 12(11): 4539-57).

35 En el proceso de síntesis, se repitió un ciclo consistente en desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación en un soporte sólido con un nucleósido conectado a él, obteniéndose así la secuencia de ARN deseada. El proceso de síntesis del ARN monocatenario se llevó a cabo usando un sintetizador de ARN (384 Synthesizer, BIONER, Corea) (véase la FIG. 6).

40 Ejemplo 2-2: Preparación de la estructura de 5' PEG-ARN

45 Se hizo reaccionar el ARN sintetizado en el ejemplo 2-1 con un reactivo de PEG fosforamidita de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN, preparando así una estructura de 5' PEG-ARN (véase el FIG. 7).

Ejemplo 2-3: Síntesis de PEG-ARN que tiene un ligando unido al extremo 5'

50 Ejemplo 2-3-1: Preparación de la estructura de NAG-PEG-ARN usando N-acetil galactosamina (NAG) fosforamidita

55 Se hizo reaccionar la estructura de 5' PEG-ARN sintetizada en el ejemplo 2-2 con el reactivo NAG fosforamidita (sintetizado en el ejemplo 1-1) de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para unir N-acetil galactosamina (NAG) a la estructura de PEG-ARN mediante un enlace fosfodiéster. El ligando de N-acetil galactosamina puede proporcionar una o más moléculas de N-acetil galactosamina a PEG usando un enlace de dendrímero.

Ejemplo 2-3-1-1: Preparación de la estructura mono NAG-PEG-ARN

60 Se hizo reaccionar estructura PEG-ARN sintetizada en el ejemplo 2-2 con el reactivo NAG fosforamidita (sintetizado en el ejemplo 1-1) de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para unir N -acetil galactosamina (NAG) a la estructura PEG-ARN mediante un enlace fosfodiéster, sintetizando así una estructura de ARN mono-NAG-PEG de 5' (véase la FIG. 8).

Ejemplo 2-3-1-2: Preparación de la estructura triple NAG-PEG-ARN

65 Se hizo reaccionar la estructura de PEG-ARN sintetizada en el ejemplo 2-2 con un reactivo de fosforamidita de dendrímero (Trebler Phosphoramidite, Glen Research, USA), y después reaccionó con el reactivo NAG fosforamidita

(sintetizado en el ejemplo 1-1) de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para unir tres NAG a la estructura PEG-ARN a través de enlaces fosfodiéster, sintetizando así una estructura triple NAG-PEG-ARN de 5' (véase la FIG. 9).

5 Ejemplo 2-3-2: Preparación de la estructura folato-PEG-ARN

Se hizo reaccionar la estructura de PEG-ARN sintetizada en el ejemplo 2-2 con un reactivo de aminofosforamidita de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para unir un grupo de amina a la estructura de PEG-ARN a través de un enlace de fosfodiéster, sintetizando así una estructura de amina-PEG-ARN. La estructura sintetizada de amina-PEG-ARN se enlazó al NHS-folato (sintetizado en el ejemplo 1-2) a través de un enlace de éster para sintetizar una estructura folato-PEG-ARN de 5' (véase la FIG. 10).

15 Ejemplo 2-3-3: Preparación de la estructura de péptido-PEG-ARN mediante la modificación de la amina y el compuesto peptídico (referencial)

La reacción de unión entre el grupo carboxilo del compuesto peptídico protegido preparado en el ejemplo 1-3 y el grupo amino de PEG de la estructura amina-PEG-ARN preparado en el ejemplo 2-3-2, se realizó usando BOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)-fosfonio hexafluorofosfato) (Sigma Aldrich, USA) y HOBT (1-hidroxibenzotriazol) (Sigma Aldrich, USA). Después de la reacción de unión, se trató el producto de reacción con piperidina (Sigma Aldrich, USA) para eliminar el grupo protector, preparando así una estructura de 5' peptido-PEG-oligo ARN de doble hélice.

20 Ejemplo 2-4: Preparación de la estructura de 5' C₂₄-ARN

Se sintetizó una estructura de ARN complementaria a la secuencia de ARN de la estructura de 5' ligando-PEG-oligo ARN de doble cadena del Ejemplo 2-3 por medio del procedimiento de síntesis de ARN del ejemplo 2-1, y después fue tratada con un reactivo C₂₄ tetradocosano que contenía un enlace disulfuro de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para unir C₂₄ a la estructura de ARN mediante un enlace de fosfodiéster, sintetizando de este modo una estructura de 5' C₂₄ ARN (véase la FIG 11).

30 Ejemplo: 2-5: Recuperación e hibridación

Cada uno de los ARN monocatenarios sintetizados en los ejemplos 2-1, 2-2, 2-3 y 2-4 fue tratado con amoníaco al 28 % (v/v) en un baño de agua a 60 °C para separar los ARN sintetizados y las estructuras de ARN de los CPG, seguido de la desprotección. Las estructuras de 5' ligando-PEG-ARN bicatenario y las estructuras de 5' C₂₄-oligo ARN de doble cadena fueron tratadas con una mezcla 10:3:4 (v/v/v) de *N*-metilpirrolidona, trietilamina y trihidrofluoruro de trietilamina en un horno a 70 °C para eliminar 2'TBDMS (tert-butilo-dimetilsilo).

Los ARN fueron separados de los reactivos por medio de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para separar los ARN, y los pesos moleculares de los ARN fueron medidas por MALDI-TOF MS (SHIMADZU, Japón) para determinar si los ARN eran consistentes con las secuencias de nucleótidos deseadas y las estructuras de oligo ARN de doble hélice.

A continuación, para preparar una estructura de oligo ARN de doble hélice con un ligando unido a ella, el PEG-ARN unido a ligando de PEG-ARN, el ARN sentido y el ARN antisentido se mezclaron entre sí en la misma cantidad, y la mezcla fue añadida a 1X tampón de hibridación (30 mM HEPES, 100 mM de acetato de potasio, 2 mM de acetato de magnesio, pH 7,0~7,5) y se dejó reaccionar en un baño de agua a temperatura constante de 90 °C durante 3 minutos, y después se dejó reaccionar a 37 °C, preparando así una estructura deseada de oligo ARN de doble hélice con un ligando unido al extremo 5' de cada una de las cadenas. El oligo ARN de doble hélice preparado que tiene el ligando unido al extremo 5' fue sometido a electroforesis para confirmar la hibridación de las cadenas.

45 Ejemplo 3: Preparación de la estructura de oligo ARN de doble hélice con ligando unido al extremo 3'

Se sintetizó amina-CPG en 3' amina-PEG-ARN usando un reactivo PEG fosforamidita, y después se enlazó a un ligando NHS tal como NHS-folato del ejemplo 1-2 a través de un enlace de éster, sintetizando así una estructura de PEG-oligo ARN de doble cadena con un ligando unido al extremo 3'. La estructura sintetizada de PEG-oligo ARN de doble cadena con un ligando unido al extremo 3' fue unida al material hidrófobo C₂₄ para formar PEG-ARN-C₂₄ con un ligando unido al extremo 3'. El PEG-RNA-C₂₄ fue hibridado con un ARN complementario para sintetizar una estructura de oligo ARN de doble hélice con un ligando unido al extremo 3'.

60 Ejemplo 3-1: Preparación de la estructura de 3' amina-PEG-ARN

Se trató amine-CPG con un reactivo de polietilenglicol fosforamidita de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para sintetizar 3' CPG-amina-PEG. La 3' CPG-amina-PEG fue sintetizada en una estructura de 3' CPG-amina-PEG-ARN que tiene una secuencia de ARN deseada de acuerdo con el proceso de síntesis de ARN del ejemplo 2-1 (véase la FIG. 12).

Ejemplo 3-2: Preparación de la estructura de 3' amina-PEG-ARN-C₂₄

5 La estructura de 3' CPG-amina-PEG-ARN sintetizada en el ejemplo 3-1 fue tratada con un reactivo C₂₄ tetradocosano que contenía un enlace disulfuro de acuerdo con un proceso general de síntesis de ARN para unir el C₂₄ al ARN a través de un enlace de fosfodiéster, sintetizando así una estructura de 3' amina-PEG-ARN-C₂₄ (véase la FIG. 13).

Ejemplo 3-3: Preparación de la estructura del PEG-ARN-C₂₄ con ligando unido al extremo 3'

10 La estructura de 3' amina-PEG-ARN-C₂₄ sintetizada en el ejemplo 3-2 fue tratada con amoníaco al 28 % en un baño de agua a 60 °C para separar la estructura sintetizada de 3' amina-PEG-oligo-ARN de doble cadena y la estructura de 3' amina-PEG-ARN-C₂₄ de la CPG, seguida de desprotección. La estructura desprotegida de 3' amina-PEG-ARN-C₂₄ tratada con una mezcla de 10:3:4 (v/v/v) de N-metilpirrolidona, trietilamina y trihidrofluoruro de trietilamina en un horno a 70 °C para eliminar 2' TBDMS (tert-butildimetilsilo). La estructura separada de 3' amina-PEG-ARN-C₂₄ se enlazó a un material de ligando tal como el NHS-ligando por medio de un enlace de éster, sintetizando así una estructura de PEG-ARN-C₂₄ con un ligando unido al extremo 3'.

Ejemplo 3-3-1: Preparación de la estructura 3' folato-PEG-ARN

20 Se enlazó la estructura amina-PEG-ARN-C₂₄ sintetizada en el ejemplo 3-2, al NHS-folato (sintetizado en el ejemplo 1-2) por medio de un enlace éster para sintetizar una estructura 3' folato-PEG-ARN-C₂₄ (FIG. 14).

Ejemplo 3-4: Preparación de la estructura de ARN complementaria

25 Se sintetizó un ARN monocatenario complementario a la secuencia de la estructura de 3' ligando-PEG-ARN-C₂₄ del ejemplo 3-3 por el procedimiento de síntesis de ARN del ejemplo 2-1. Los ARN monocatenarios sintetizados fueron tratados con amoníaco al 28 % en un baño de agua a 60 °C para separar los ARN sintetizados del CPG, seguido por la desprotección. Los ARN desprotegidos se trataron con una mezcla de 4:3:10 (v/v/v) de N-metilpirrolidona, trietilamina y trihidrofluoruro de trietilamina en un horno a 70 °C para eliminar 2' TBDMS (2' tert-butildimetilsilo).

Ejemplo 3-5: Hibridación

35 El ARN y los productos de reacción de la estructura de 3' ligando-PEG RNA-C₂₄ se separaron de los reactivos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC; LC-20A prominence, SHIMADZU, Japón), y los pesos moleculares de los materiales separados fueron medidos por MALDI TOF-MS (SHIMADZU, Japón) para determinar si eran consistentes con la secuencia de nucleótidos deseada y la estructura de 3' ligando-PEG RNA-C₂₄.

40 A continuación, para preparar una estructura de oligo-ARN de doble hélice con un ligando unido a ella, el PEG-ARN unido a ligando de PEG-ARN, el ARN sentido y el ARN antisentido se mezclaron entre sí en la misma cantidad, y la mezcla fue añadida a 1X tampón de hibridación (30 mM HEPES, 100 mM de acetato de potasio, 2 mM de acetato de magnesio, pH 7,0~7,5) y se dejó reaccionar en un baño de agua a temperatura constante de 90 °C durante 3 minutos, y después se dejó reaccionar a 37 °C, preparando así una estructura deseada de oligo-ARN de doble hélice con un ligando unido al extremo 3' de cada una de las cadenas. El oligo-ARN de doble hélice preparado que tiene el ligando unido al extremo 3' fue sometido a electroforesis para confirmar la hibridación de las cadenas.

Ejemplo 4: Formación de nanopartículas compuestas de estructuras de oligo-ARN de doble hélice con un ligando unido de la misma

50 Las estructuras de oligo-ARN de doble hélice que tienen el ligando al extremo 5', y las estructuras de oligo-ARN de doble hélice que tienen el ligando al extremo 3', sintetizadas en los ejemplos 2 y 3, forman una nanopartícula (es decir, una micela) compuesta de estructuras de oligo-ARN de doble hélice unido a ligando por medio de interacciones hidrófobas entre los materiales hidrófobos unidos a los extremos de los ARN de oligo de doble hélice (véase la FIG. 1). Se midieron las mediciones de tamaño y de concentración de micela crítica (CMC) y el análisis de microscopio electrónico de transmisión (TEM) para una nanopartícula compuesta por el 5' folato-ligando-oligo-ARN de doble cadena sintetizado en el ejemplo 2 para confirmar la formación de la nanopartícula.

Ejemplo 4-1: Medición del tamaño de partícula de las nanopartículas compuestas de estructuras de 5' folato-oligo-ARN de doble cadena

60 El tamaño de la nanopartícula se midió mediante la medición del potencial zeta. Específicamente, las estructuras de 5' folato-oligo-ARN de doble cadena se disolvieron en 1,5 ml de DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) a una concentración de 50 µg/ml, y a continuación se homogeneizaron con un sonicador (Wiseclean, DAIHAN, Corea) (700 W; amplitud: 20 %). El tamaño de las nanopartículas homogeneizadas se midió con un Zetasizer (Nano-ZS, MALVERN, GB) en las siguientes condiciones: Índice de refracción: 1,459, índice de absorción: 0,001, temperatura del disolvente PBS (solución salina tamponada con fosfato: 25 °C, viscosidad a esa temperatura: 1,0200), e índice de refracción: 1,335. Cada medición constaba de 20 lecturas y se repitió tres veces.

Se encontró que las nanopartículas (folato-SAMiRNA) compuestas por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a folato tenían un tamaño de aproximadamente 100-200 nm. Un valor inferior del índice de polidispersión (PDI) indica una distribución más uniforme de las partículas. El valor de la PDI del folato-SAMiRNA se midió resultando menor de 0,4, lo que sugiere que se formaron nanopartículas con un tamaño relativamente uniforme. Se encontró que el tamaño de las nanopartículas compuestas de estructuras de este tipo es adecuado para la absorción en las células por endocitosis (Nanotoxicology: nanoparticles reconstruct lipids. Nat Nanotechnol. 2009 Feb;4(2):84-5) (see FIG. 15(A)).

10 Ejemplo 4-2: Medición de la concentración de micela crítica de nanopartículas compuestas de estructuras de oligo ARN de doble hélice

Un material anfifílico que contenga tanto un grupo oleofílico como un grupo hidrófilo en la molécula puede actuar como agente tensioactivo. Cuando un agente tensioactivo se disuelve en una solución acuosa, los restos hidrófobos se orientan hacia el interior para evitar el contacto con el agua, y los restos hidrófilos se orientan hacia el exterior, formando así una micela. La concentración a la que se forma la micela por primera vez se define como la concentración de micela crítica (CMC). Un procedimiento para medir la CMC usando un tinte fluorescente se basa en un cambio rápido en la pendiente del gráfico de intensidad de fluorescencia de un tinte fluorescente antes y después de la formación de la micela.

Para la medición de la concentración de micela crítica de las nanopartículas compuestas por las estructuras de oligo ARN de doble cadena unido a folato, se preparó 0,04 mM de DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno, Sigma Aldrich, EE.UU.) como colorante fluorescente. 1 nmole/ μ l de los 5' folato-oligo ARN de doble cadena sintetizados en el ejemplo 2 se diluyó con DPBS en series de 0,0977 μ g/ml a 50 μ g/ml, preparando así 180 μ l de cada una de las muestras de estructura de 5' folato-oligo ARN doble cadena. A la muestra preparada se añadieron y agitaron bien 20 μ l de cada uno de 0,04 mM de DPH en metanol y metanol solo como control. A continuación, la homogeneización con un sonicador (Wiseclean, DAIHAN, Corea) se realizó de la misma manera que se describe en el ejemplo 4-1 (700 W; amplitud: 20 %). Se permitió que cada una de las muestras homogeneizadas reaccionara a temperatura ambiente en condiciones de protección frente a la luz durante unas 24 horas, y las intensidades de fluorescencia (excitación: 355 nm, emisión: 428 nm, lectura superior). Debido a que las intensidades de fluorescencia medidas se usan para determinar la intensidad de fluorescencia relativa, se calculó la intensidad de fluorescencia relativa ([intensidad de fluorescencia de la muestra que contiene DPH]-[intensidad de fluorescencia de la muestra que contiene metanol solo]) a la misma concentración y se mostró gráficamente en el eje Y como una función del valor logarítmico de la concentración de estructuras de 5' folato- oligo ARN de doble cadena (eje X) (véase la FIG. 15(B)).

Las intensidades de fluorescencia medidas a varias concentraciones aumentan a medida que aumenta la concentración, y el punto en el que la concentración aumenta rápidamente es la concentración de CMC. Así, la región de baja concentración en la que no aumentó la fluorescencia y la región de alta concentración en la que aumentó la intensidad de la fluorescencia se dividieron en varios puntos para trazar líneas de tendencia, y el valor del eje X en el que las dos líneas de tendencia se cruzaron entre sí se determinó como la concentración de CMC (FIG. 15(B)). La CMC medido de la estructura folato- oligo ARN de doble cadena fue muy bajo (1,33 μ g/ml), lo que sugiere que el folato-SAMiRNA puede fácilmente formar micelas a una concentración muy baja.

45 Ejemplo 4-3: Observación de la estructura de oligo ARN de doble hélice mediante microscopio electrónico de transmisión (TEM)

Por medio del microscopio electrónico de transmisión (TEM) se observó la morfología de las nanopartículas formadas de las estructuras folato- oligo ARN de doble cadena.

Específicamente, las estructuras de folato-oligo ARN de doble cadena se disolvieron en DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco) a una concentración final de 100 ng/ml, y luego se homogeneizaron con un sonicador (Wiseclean, DAIHAN, Corea) (700 W; amplitud: 20 %). Las nanopartículas formadas de las estructuras folato-oligo ARN de doble cadena se observaron mediante tinción negativa con un material de alta densidad de electrones. Las nanopartículas observadas por el microscopio electrónico de transmisión (TEM) tenían un tamaño similar al tamaño de las nanopartículas medido en el ejemplo 4-1, lo que sugiere que las nanopartículas se formaron fácilmente.

Ejemplo 5: Administración *in vitro* de estructuras de ARN de doble cadena unido a ligando

Con el fin de examinar si las nanopartículas (folato-SAMiRNA) compuestas por las estructuras de 5' folato-oligo ARN de doble cadena sintetizadas en el ejemplo 2 muestran efectos mejorados del oligo ARN de doble hélice *in vitro*, la línea celular KB que sobreexpresa el receptor folato se cultivó en presencia o ausencia de folato sin transfección. Como resultado, se encontró que el ligando enlazado elevaba la eficiencia de la administración intracelular del SAMiRNA y que el SAMiRNA exhibió el efecto de inhibir la expresión del gen diana.

Ejemplo 5-1: Cultivo de la línea celular tumoral

La línea celular del carcinoma epitelial oral humano (KB) adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC) se cultivó en medio libre de folatos RPMI-1640 (Gibco, EE.UU.) suplementado con FBS al 100 % (v/v), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, en condiciones de 37 °C y un 5 % (v/v) CO₂.

Ejemplo 5-2: Transfección de la línea celular tumoral con folato-SAMiRNA

Las células tumorales (1,3 × 10⁵ células/pocillo) cultivadas en el ejemplo 5-1 se cultivaron en un medio libre de folato RPMI-1640 en una placa de 6 pocillos durante 18 horas bajo las condiciones descritas en el ejemplo 5-1, y luego se retiró el medio y se añadió a cada pocillo la misma cantidad de medio Opti-MEM.

Nanopartículas (SAMiRNA-Sur) compuestas de estructuras de oligo ARN de doble hélice que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1 que inhibe la expresión de la survivina del gen diana, nanopartículas (SAMiRNA-con) compuestas de estructuras de oligo ARN de doble hélice que comprenden una secuencia de control de SEQ ID NO: 2, y nanopartículas (Folato-SAMiRNA-Sur) compuestas de estructuras folato de oligo ARN de doble cadena unido a ligando que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 1, se disolvieron en DPB a una concentración de 50 µg/ml según el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 4-1, y se homogeneizaron por medio de ultrasonidos, obteniéndose así nanopartículas homogeneizadas compuestas de cada una de las estructuras.

Para crear un estado en el que hay una cantidad excesiva de folato en el medio Opti-MEM, se añadió adicionalmente folato al medio para crear un estado que contenía 1 mM de folato y se añadió un estado en el que no se añadió folato. A continuación, las células fueron tratadas con 200 nM de cada una de las muestras y se cultivaron en condiciones de 37 °C y un 5 % (v/v) de CO₂ durante 48 horas.

Ejemplo 5-3: Análisis cuantitativo relativo del ARNm del gen de la survivina

El ARN total se extrajo de la línea celular transfectada del ejemplo 5-2 y se sintetizó en ADNc, y a continuación se cuantificó el nivel de expresión relativa de la survivina mediante PCR en tiempo real de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de patente de Corea abierta a inspección pública N°2009-0042297.

SAMiRNA-con es un grupo de prueba tratado con nanopartículas compuestas de estructuras de oligo ARN de doble hélice que comprende una secuencia de control de SEQ ID NO: 2, y SAMiRNA-Sur es un grupo de prueba tratado con nanopartículas compuestas de estructuras de oligo ARN de doble hélice que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 (secuencia de survivina). Folato-SAMiRNA-Sur es un grupo de prueba tratado con nanopartículas compuestas de estructuras folato-oligo ARN de doble cadena que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1 (secuencia de survivina).

El grado de inhibición de la expresión del ARNm diana fue el nivel de expresión del gen diana en el grupo de prueba tratado con cada uno de los genes SAMiRNA-Sur y Folato-SAMiRNA-Sur en relación con el nivel de expresión del gen diana en el grupo de prueba tratado con SAMiRNA-con y se determinó por medio de cuantificación comparativa (véase la FIG. 16).

Cuando una cantidad excesiva de folato estaba presente en el medio, se pudo ver que el receptor de folato en la línea celular KB estaba saturado con una cantidad excesiva de folato, y por lo tanto el efecto de promover la internalización intracelular por el ligando folato unido a SAMiRNA quedó enmascarado, sugiriendo que el ligando folato influye en la eficacia de la administración intracelular de SAMiRNA para desempeñar un papel crucial en la inhibición de la expresión de mRNA del gen diana.

En el caso del grupo tratado con SAMiRNA-Sur, no hubo diferencia significativa en la inhibición de la expresión del gen diana entre la presencia y la ausencia de folato, Pero en el caso del grupo tratado con folato-SAMiRNA-Sur, la inhibición de la expresión del gen diana fue aproximadamente dos veces mayor en ausencia de folato que en presencia de folato. En otras palabras, cuando se observó una cantidad excesiva de folato, no se observó el cambio en el efecto inhibitorio de la expresión génica diana por el ligando unido a folato, pero cuando el folato estaba ausente, se observó un aumento en el efecto inhibitorio de la expresión génica diana por el ligando unido a folato.

Por lo tanto, se puede observar que las nanopartículas compuestas por las estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a ligando muestran una mayor eficiencia de la administración intracelular y una mayor inhibición del gen diana en las células en las que el receptor de ligando está sobreexpresado.

Ejemplo 6: Administración *in vivo* de la estructura de oligo ARN de doble hélice unido a ligando

Con el fin de examinar si las nanopartículas (folato-SAMiRNA) compuestas por las estructuras de 5' folato-oligo ARN de doble cadena sintetizadas en el ejemplo 2 realzan el efecto del oligo ARN de doble cadena en condiciones *in vivo*, se administraron las nanopartículas a un ratón que tenía un tumor compuesto por la línea celular KB que sobreexpresaba el receptor de folato, y se examinaron los efectos de folato-SAMiRNA y SAMiRNA sobre la inhibición de la expresión del gen diana en el tejido.

Ejemplo 6-1: Preparación del modelo de xenoinjerto KB

5 La línea celular KB cultivada en el ejemplo 5-1 se inyectó subcutáneamente a cada uno de los ratones desnudos de 5 semanas de edad (BALB/C nu) con una densidad de 1×10^6 células. Después de la inyección, se observó el crecimiento del tumor midiendo las longitudes del eje largo y del eje corto del tumor a intervalos de 2 días, y se demostró que el tumor creció a un volumen de aproximadamente 150-200 mm³ a las 2 semanas después de la inyección.

10 Ejemplo 6-2: Estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a ligando y administración de estructuras de oligo ARN de doble hélice unido a ligando

15 Para la administración en el modelo de xenoinjerto KB preparado en el ejemplo 6-1, las estructuras de 5' folato-oligo ARN de doble cadena que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1, sintetizado en el ejemplo 2, y estructuras de ARN de doble cadena sin ligando, se homogeneizaron de la misma manera que se describe en el ejemplo 4-1, obteniéndose así nanopartículas homogeneizadas compuestas de estructuras de oligo ARN de doble hélice. Las nanopartículas homogeneizadas se administraron una vez en la vena de la cola de los modelos de xenoinjerto KB (n=4) a una dosis de 5 mg/kg de peso corporal), y el tejido tumoral se recolectó a las 48 o 72 horas después de la administración. El ARN total se extrajo del tejido tumoral recogido y se sintetizó en ADNc, y a continuación se cuantificó el nivel de expresión relativa del ARNm de survivina mediante PCR en tiempo real de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de patente coreana abierta a inspección pública N° 2009-0042297 (véase la FIG. 17).

25 En LA FIG. 17, PBS es un grupo de prueba en el que se administró solo un disolvente como control negativo, SAMiRNA es un grupo de prueba en el que se administraron nanopartículas compuestas por las estructuras de oligo ARN de doble hélice sin ligando, y Folato-SAMiRNA es un grupo de prueba en el que administraron nanopartículas compuestas de las estructuras 5' folato-oligo ARN de doble cadena.

30 El efecto inhibitorio de la expresión génica diana del SAMiRNA fue mayor a las 72 horas después de la administración que a las 48 horas después de la administración. La inhibición de la expresión del gen diana en el grupo al que se administró la estructura unida a ligando (Folato-SAMiRNA) fue del 160 % a las 48 horas después de la administración y del 120 % a las 72 horas después de la administración.

35 Por lo tanto, se puede ver que la estructura de ARN de doble cadena que tiene el ligando folato unido a él se proporcionaron rápidamente en el tejido tumoral diaba *in vivo* que sobreexpresa el receptor folato, de modo que se mejora el efecto del oligo ARN de doble hélice, y que el efecto se mantiene incluso con el paso del tiempo.

Ejemplo 7: Preparación de conjugado de polímero y ASO (referencial)

40 En los ejemplos de la presente invención, se usó un ASO de survivina para inhibir la acción de la survivina (Biol. Proced. Online 2004; 6(1): 250-256). La survivina es una proteína que se expresa comúnmente en la mayoría de los tumores o líneas celulares mutantes que se han probado hasta la fecha y se espera que sea una diana importante en la terapia contra el cáncer (Abbrosini G. et al. Nat. Med. 3(8):917-921, 1997).

45 Los ASO usados en los siguientes ejemplos son una secuencia específica de survivina establecida en el SEQ ID NO: 3: 3 y una secuencia de control establecida en SEQ ID NO: 4.

(SEQ ID NO: 3) ASO de survivina (ISIS 23722), 5-TGTGCTATTCTGTGAATT-3
(SEQ ID NO : 4) Control codificado (ISIS 28598), 5-TAAGCTGTTATGTGTGTT-3

50 Las secuencias de ASO se sintetizaron enlazando los nucleótidos por medio de los enlaces de fosfodiéster del esqueleto del ADN usando β-cianoetilfosforamidita (Shina et al. Nucleic Acids Research , 12:4539-4557, 1984).

55 En el proceso de síntesis del ASO, se repitió un ciclo consistente en desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación sobre un soporte sólido (CPG) que tiene un nucleósido fijado al mismo, obteniéndose así una secuencia de ADN deseada.

60 Específicamente, en un paso de desbloqueo que es el primer paso, se trata un CPG, que tiene un nucleósido conectado a él, con ácido tricloroactéico (TCA) al 3 % para eliminar el DMT (4,4'-dimetoxitritilo). En un paso de acoplamiento, que es el siguiente paso, se enlazan las cadenas de nucleótidos entre sí por medio de la reacción de enlace entre el grupo de 5'-hidroxilo formado en el CPG en el paso anterior y un monómero nucleosídico de fosforamidita que tiene una secuencia deseada. En un paso de adición de una caperuza (capping), que es el tercer paso, un grupo de 5'-hidroxilo que no se hace reaccionar en el paso de acoplamiento se bloquea para eliminar la formación de una cadena de nucleótidos con una secuencia de nucleótidos no deseada en el paso de acoplamiento del siguiente ciclo. En el paso de adición de una caperuza (capping), el grupo de 5'-hidroxilo que no se hace reaccionar es acetilado tratándolo con anhídrido acético y N-metilimidazol. En un paso de oxidación, que es el paso final, el enlace de fosfito triéster entre un grupo de 5'-hidroxilo y fosforamidita, formado en el paso de acoplamiento, se convierte en

un enlace de fosfodiéster. En este paso de oxidación, el enlace del fosfito triéster se trata con una solución oxidante de 0,02 M (0,02 M-12 en THF/piridina/H₂O) para convertir el fosfato en fosfato. Se realizó una serie de procesos para sintetizar el ASO usando un sintetizador de ADN (384 Synthesizer, BIONER, Corea).

5 En un proceso de síntesis de un conjugado de polímero y ASO (3'PEG-ASO-5'lipídico), se sintetizó un ASO mediante desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación de un soporte de 3' PEG-CPG con el material hidrófilo PEG en el extremo 3', y el material hidrófobo C₂₄ tetradocosano que contenía un enlace disulfuro se fijó al extremo 5', preparando de este modo un conjugado de ASO y polímero (véase la publicación de patente coreana abierta a inspección pública N° 2009-0042297).

10 Además, para preparar un 3'ligando-PEG-ASO-5'lipido, se fijó el PEG a un CPG que tenía un grupo funcional, tal como un grupo amina, unido a él, usando un reactivo de PEG fosforamidita por medio de un proceso consistente en el desbloqueo, el acoplamiento, la adición de una caperuza (capping) y la oxidación, y el material hidrófobo C₂₄ tetradocosano que contenía un disulfuro que se fijó al extremo 5', preparando así un grupo funcional 3' PEG-ASO-5'-lipido al cual se puede fijar un ligando deseado. Tras la finalización de la síntesis, se trató el producto de reacción con amoníaco al 28 % en un baño de agua a 60 °C para separar el conjugado de polímero y ASO, al que se puede fijar un ligando, a partir del CPG. Después, se fijó un ligando al conjugado por el grupo funcional, preparando así un conjugado de polímero ASO (3' ligando-PEG-ASO-5'lipido).

20 Sin embargo, para sintetizar un conjugado de polímero y ASO (3'lipid-ASO-5'PEG), se sintetizó un ASO en un CPG que tenía un grupo funcional, tal como un grupo amina, por un proceso consistente en desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación, y el PEG se adjuntó al extremo 5' usando PEG fosforamidita, preparando así un conjugado de grupo funcional-ASO-polímero hidrófilo. Después de completar la síntesis del conjugado de grupo funcional-ASO-polímero hidrófilo, se trató el producto de reacción con amoníaco al 28 % (v/v) en un baño de agua a 60 °C para separar el conjugado de grupo funcional-ASO-polímero hidrófilo del CPG, y después se fijó un material hidrófobo al conjugado a través del grupo funcional, preparando así un conjugado de polímero y ASO que tiene acoplados a él los materiales hidrófilos e hidrófobos deseados. Después, el conjugado de polímero y ASO fue separado y purificado de los reactivos por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (LC-20A Prominence, SHIMADZU, Japón), y se midieron los pesos moleculares del ASO y del conjugado de polímero y ASO mediante MALDI TOF-MS (SHIMADZU, Japón) para determinar si se obtuvo la secuencia de nucleótido que había que sintetizar.

Ejemplo 8: Síntesis del conjugado de polímero y ASO modificado con fosfotioato (referencial)

35 El ASO usado en este ejemplo se obtuvo sustituyendo el grupo fosfato del esqueleto del ADN por un grupo de fosfotioato para obtener S-oligos y uniendo los S-oligos por enlaces de fosfotioato.

40 Específicamente, se sintetizó un ASO compuesto de S-oligos por medio de un proceso consistente en desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación, en el cual el paso de oxidación se realizó por tratamiento con reactivo sulfurante 0,1 M en lugar de solución oxidante 0,02 M. Mediante este proceso de síntesis de ASO, se sintetizaron ASO modificados con fosfotioato que tienen secuencias de SEQ ID NO 3 y 4 (Shina et al. Nucleic Acids Research, 12:4539-4557, 1984). El resto de los procesos de síntesis usados en este ejemplo eran similares a los usados en el ejemplo 7.

45 Para sintetizar un ASO en el que se modificaron 4 nucleótidos en ambos extremos (extremos 5' y 3') con 2-OCH₃ (metoxi), se sintetizó un nucleósido en la región modificada en forma de 2'-OCH₃-ADN usando 2'-OCH₃-ADN-cianoetil fosforamidita [rA(Bz),rC(Ac),rG(ibu),rU] para sustituir el esqueleto de AND con fosfotioato y después, tal como se ha descrito anteriormente, se sintetizó el esqueleto de AND enlazando S-oligos a través de uniones fosfotioatos.

50 Con el fin de preparar un conjugado de polímero y ASO modificado por fosfotioato, se sintetizó un conjugado de ASO modificado con fosfotioato en un soporte de 3'PEG-CPG mediante un ciclo consistente en desbloqueo, acoplamiento, adición de una caperuza (capping) y oxidación tal como se conoce en la técnica (véase la publicación de patente coreana abierta a inspección pública N° 2009-0042297), y después se fijó el material hidrófobo C₂₄ tetradocosano, que contenía un elemento disulfuro, al extremo 5', preparando un conjugado deseado de polímero y ASO modificado con fosfotioato.

55 Además, para unir un ligando al extremo del material hidrófilo del conjugado de polímero y ASO modificado por fosfotioato, se fijó al CPG 3' un grupo funcional al que se puede unir un ligando, y después se unió al CPG un material hidrófilo y se llevó a cabo la reacción descrita anteriormente, preparando así un conjugado de polímero y ASO al cual se puede fijar un ligando.

60 Después de completar la síntesis del conjugado de polímero y ASO, el producto de reacción fue tratado con amoníaco al 28 % (v/v) en un baño de agua a 60 °C para separar del CPG el ASO y el conjugado polímero y ASO. Después se separó el conjugado de polímero y ASO y se purificó de los reactivos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (LC-20A Prominence, SHIMADZU, Japón), y se midieron los pesos moleculares del ASO y del conjugado de

65

polímero y ASO mediante MALDI TOF-MS (SHIMADZU, Japón) para determinar si se había obtenido la secuencia de nucleótidos a sintetizar (véase la FIG. 19).

Ejemplo 9: Evaluación de la estabilidad del conjugado de polímero y ASO en condiciones que imitan las condiciones *in vivo* (referencial)

Para examinar si la estabilidad de los conjugados de polímero y ASO, sintetizados y separados en los ejemplos 7 y 8, había aumentado en comparación con la del ASO original sin ningún polímero unido, se realizó el siguiente experimento. Específicamente, se incubaron un ASO sin polímero unido a él y el conjugado de polímero y ASO en medios que contenían FBS (suero fetal bovino) al 50 % y al 30 % (v/v), que imitan las condiciones *in vivo*, para 0, 3, 5, 7 y 10 días, y luego se analizó la degradación del conjugado de polímero y ASO, en comparación con la del ASO original, por medio de electroforesis o de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Como resultado, el conjugado de polímero y ASO era estable independientemente de la concentración de FBS, aunque el PEG se separó del ASO con el paso del tiempo, mientras que la estabilidad del ASO sin ningún polímero unido comenzó a disminuir después del día 3.

Ejemplo 10: Análisis de las propiedades físicas de la nanopartícula compuesta de conjugados de polímero y ASO (referencial)

Los conjugados de polímero y ASO forman una nanopartícula compuesta por los conjugados de polímero y ASO por interacción entre los materiales hidrófobos fijados a los extremos de los ASO (véase la FIG. 18). El tamaño y la concentración de micela crítica (CMC) de las nanopartículas compuestas por conjugados de polímero ASO se midieron mediante la medición del potencial zeta.

Ejemplo 10-1: Medición de nanopartículas compuestas de conjugados de polímero y ASO

El tamaño de las nanopartículas compuestas por conjugados de polímero ASO, preparadas en el ejemplo 8 y que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 3, se midió mediante la medición del potencial zeta. Específicamente, 50 µg de conjugados de polímero ASO se disolvieron en 1 ml de DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco), y luego se homogeneizaron con un sonicador (Wiseclean, DAIHAN, Corea) (700 W; amplitud: 20 %). El tamaño de las nanopartículas homogeneizadas se midió mediante el dispositivo de medición de potencial zeta (Nano-ZS, MALVERN, Inglaterra) en las siguientes condiciones: Índice de refracción: 1,454, índice de absorción: 0,001, temperatura del agua como disolvente: 25 °C. Cada medición constaba de 20 lecturas de tamaño y se repitió tres veces.

Se pudo observar que las nanopartículas formadas por los conjugados de polímero y ASO tenían un tamaño de 100-200 nm y un índice de polidispersión (PDI) inferior a 0,4 (véase la FIG. 20(A)). Un valor inferior del índice de polidispersión (PDI) indica una distribución más uniforme de las partículas. Por lo tanto, se puede ver que las nanopartículas formadas por los conjugados de polímero ASO tienen un tamaño relativamente uniforme, que es adecuado para la absorción en las células por endocitosis (Kenneth A. Dawson et al. *nature nanotechnology* 4:84-85, 2009).

Ejemplo 10-2: Medición de la concentración de micela crítica de conjugados de polímero y ASO

Un material anfifílico que contenga tanto un grupo oleófilo como un grupo hidrófilo en la molécula puede actuar como agente tensioactivo. Cuando se disuelve un agente tensioactivo en una solución acuosa, los restos hidrófobos se orientan hacia el interior para evitar el contacto con el agua y los restos hidrófilos se orientan hacia el exterior, formando así una micela. La concentración a la que se forma la micela por primera vez se define como concentración de micela crítica (CMC). Un procedimiento para medir la CMC usando un tinte fluorescente se basa en un cambio rápido en la pendiente del gráfico de intensidad de fluorescencia de un tinte fluorescente que cambia rápidamente antes y después de la formación de la micela.

Para la medición de la concentración de micela crítica de las nanopartículas compuestas por conjugados de polímero ASO, se preparó 0,04 mM DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno, SIGMA, EE.UU.) como colorante fluorescente. 1 nmole/µl de los conjugados de polímero y ASO que comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 3 se diluyeron con DPBS en serie de 0,0977 µg/ml a 50 µg/ml, preparando así 180 µl de cada una de las muestras de conjugado de polímero y ASO. A la muestra preparada se añadieron y agitaron bien 20 µl de cada 0,04 mM DPH en metanol y metanol solo como control. A continuación se realizó la homogeneización, usando un sonicador (Wiseclean, DAIHAN, Corea), de la misma manera que se describe en el ejemplo 10-1 (700 W; amplitud: 20 %). Se permitió que cada una de las muestras homogeneizadas reaccionara a temperatura ambiente en condiciones de protección frente a la luz durante unas 24 horas, y se midieron las intensidades de fluorescencia (excitación: 355 nm, emisión: 428 nm, lectura superior). Debido a que las intensidades de fluorescencia medidas se usan para determinar la intensidad de fluorescencia relativa, se calculó la intensidad de fluorescencia relativa ([intensidad de fluorescencia de la muestra que contiene DPH]/[intensidad de fluorescencia de la muestra que contiene metanol solo]) a la misma concentración y se mostró

gráficamente en el eje Y en función del valor logarítmico de la concentración de los conjugados de polímero y ASO (eje X) (véase la FIG. 20(B)).

5 Las intensidades de fluorescencia medidas a varias concentraciones aumentan a medida que aumenta la concentración, y el punto en el que la concentración aumenta rápidamente es la concentración de CMC. Así, la región de baja concentración en la que la fluorescencia no aumentó y la región de alta concentración en la que aumentó la intensidad de la fluorescencia se dividieron en varios puntos para trazar líneas de tendencia, y se determinó el valor del eje X en el que las dos líneas de tendencia se cruzaron entre sí como la concentración CMC. La CMC medida de los conjugados de polímero y ASO fue muy baja (1,56 µg/ml), lo que sugiere que las nanopartículas formadas por los
10 conjugados de polímero y ASO pueden formar micelas fácilmente, incluso a una concentración muy baja.

Ejemplo 11: Inhibición de la expresión del gen diana en la línea celular tumoral por el conjugado de polímero y ASO y reactivo de transfección (referencial)

15 Cada uno de los ASO sin conjugado de polímero y el conjugado de polímero y ASO, preparados en el ejemplo 8, se transfectaron en una línea celular humana de cáncer colorrectal (SW480) como una línea celular tumoral, y se analizaron los patrones de expresión de survivina en la línea celular tumoral transfectada.

Ejemplo 11-1: Cultivo de la línea celular tumoral

20 La línea celular del cáncer colorrectal humano (SW480) obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC) se cultivó en un medio de cultivo (medio L-15 de Leibovitz, GIBCO/Invitorgen; EE.UU.), complementado con FBS al 10 % (v/v), 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina, en condiciones de 37 °C y el 5 % (v/v) de dióxido de carbono (CO₂).

Ejemplo 11-2: Transfección de la línea celular tumoral con conjugado de polímero y ASO

25 Cada uno de los ASO sin conjugado de polímero y el conjugado de polímero y ASO, preparados en el ejemplo 8, se transfectaron en una línea celular humana de cáncer colorrectal (SW480) como una línea celular tumoral, y se analizaron los patrones de expresión de survivina en la línea celular tumoral transfectada.

30 La línea celular tumoral cultivada en el ejemplo 11-1 se cultivó en un medio de cultivo (medio Leibovitz L-15, GIBCO/Invitorgen; EE.UU.) en una placa de 6 pocillos con una densidad de $1,3 \times 10^5$ células durante 18 horas en las condiciones descritas en el ejemplo 11-1, y después se desechó el medio de cultivo y se añadieron 800 µl de Opti-MEM (modificación del medio mínimo de Eagle GIBCO/Invitorgen; EE.UU.) a cada pocillo.

35 Mientras tanto, se mezclaron 2 µl de Lipofectamine 2000 y 198 µl de medio Opti-MEM y se permitió que reaccionaran a temperatura ambiente durante 5 minutos. El producto de reacción fue tratado con 25 pmol/µl de cada uno de los conjugados de polímero y ASO, preparados en los ejemplos 7 y 8, hasta concentraciones finales de 10, 50 y 100 nM, y luego se permitió reaccionar a temperatura ambiente durante 20 minutos, preparando así soluciones de transfección.

40 A continuación, se añadieron 200 µl de cada una de las soluciones de transfección a cada pocillo que contenía la línea celular tumoral y Opti-MEM, y después se cultivaron las células durante 6 horas, seguido de la retirada del medio Opti-MEM. A continuación, se añadieron a cada pocillo 2,5 ml de medio de cultivo (medio L-15 de Leibovitz, GIBCO/Invitorgen; EE.UU.), y después se cultivaron las células durante 24 horas en condiciones de 37 °C y 5 % (v/v) de dióxido de carbono (CO₂).

Ejemplo 11-3: Análisis cuantitativo relativo del ARNm del gen de la survivina

45 El ARN total se extrajo de la línea celular transfectada del ejemplo 11-2 y se sintetizó en ADNc, y luego se cuantificó comparativamente el nivel de ARNm del gen de la survivina mediante PCR en tiempo real de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de la patente coreana abierta a exposición pública N° 2009-0042297 (véase la FIG. 21).

50 Para analizar los efectos inhibitorios de la expresión génica diana del ASO sin polímero conjugado en el mismo y el conjugado de polímero y ASO, se transfectaron células con cada uno del ASO y del conjugado de polímero y ASO junto con el reactivo de transfección, y a continuación se analizaron los niveles de expresión del ARNm del gen de la survivina en las células. Como resultado, se encontró que la inhibición de la expresión del gen de la survivina por el conjugado de polímero y ASO fue similar a la del ASO sin ningún polímero conjugado, sugiriendo que el polímero
55 conjugado no interfiere con el mecanismo de acción del ASO.

Ejemplo 12: Inhibición de la expresión del gen diana en la línea celular tumoral por conjugado de polímero y ASO solo (referencial)

60 Cada uno de los conjugados de polímero ASO preparados en los ejemplos 7 y 8 fue transfectado a una línea celular

humana de cáncer colorrectal (SW480) como una línea celular tumoral, y se analizaron los patrones de expresión de survivina en la línea celular tumoral transfectada.

Ejemplo 12-1: Cultivo de la línea celular tumoral

Se cultivó la línea celular del cáncer colorrectal humano (SW480), obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC), en un medio de cultivo (medio L-15 de Leibovitz, GIBCO/Invitrogen; EE.UU.), complementado con FBS al 10 % (v/v), 100 unidades/ml de penicilina y $\mu\text{g/ml}$ de estreptomycin, en condiciones de 37 °C y el 5 % (v/v) de dióxido de carbono (CO₂).

Ejemplo 12-2: Transfección de la línea celular tumoral con conjugado de polímero y ASO

La línea celular tumoral cultivada en el ejemplo 12-1 se cultivó en un medio de cultivo (medio L-15 de Leibovitz, GIBCO/Invitrogen; EE.UU.) en una placa de 6 pocillos con una densidad de $1,3 \times 10^5$ células durante 18 horas en las condiciones descritas en el ejemplo 5-1, y luego se desechó el medio y se añadieron 800 μl de medio Opti-MEM a cada pocillo.

100 μl de medio Opti-MEM y 5, 10 o 100 μl (500 nM, 1 μM o 10 μM) de cada uno de los conjugados de polímero y ASO (1 nmole/ μl) preparados en los ejemplos 1 y 2 se mezclaron entre sí y se homogeneizaron con un sonicador (Wiseclean, DAIHAN, Corea) de la misma manera que se describe en el ejemplo 4-1 (700 W; amplitud 20 %), preparando así soluciones de transfección que contienen nanopartículas homogeneizadas formadas por conjugados de material hidrófobo-ASO.

A continuación, se añadieron 100 μl de cada una de las soluciones de transfección a cada pocillo que contenía la línea celular tumoral y Opti-MEM, y las células se cultivaron durante 24 horas, tras lo cual se añadió 1 ml de medio de cultivo que contenía FBS al 20 % (medio L-15 de Leibovitz, GIBCO/Invitrogen; EE.UU.). Después, se cultivaron adicionalmente las células durante 24 horas bajo las condiciones de 37 °C y 5 % (v/v) de dióxido de carbono (CO₂). Por lo tanto, las células se cultivaron durante un total de 48 horas después del tratamiento con el conjugado polímero y ASO.

Ejemplo 12-3: Análisis cuantitativo relativo del ARNm del gen de la survivina

El ARN total se extrajo de la línea celular transfectada del ejemplo 12-2 y se sintetizó en ADNc, y después se cuantificaron por comparación los niveles de ARNm del gen de la survivina por medio de PCR en tiempo real de acuerdo con el procedimiento descrito en la publicación de la patente coreana abierta a inspección pública N° 2009-0042297.

La inhibición de la expresión de ARNm del gen de la survivina se comparó entre el ASO que no tenía ningún polímero conjugado con él y el conjugado de polímero y ASO en un estado en que no contenía reactivo de transfección. Como resultado, se pudo observar que el polímero y ASO inhibieron la expresión del gen diana a una concentración relativamente baja en comparación con el ASO no conjugado en un estado que no contenía reactivo de transfección.

Por lo tanto, se puede ver que los conjugados de polímero y ASO sintetizados en la presente invención o las nanopartículas compuestas de los conjugados de polímero y ASO se administran a células, incluso en un estado en que no contienen ningún reactivo de transfección de modo que el ASO inhibe la expresión del gen diana.

Aplicabilidad industrial

Tal como se ha descrito anteriormente, la novedosa estructura de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención y una composición farmacéutica que la comprende pueden usarse para el tratamiento del cáncer y de las enfermedades infecciosas de una manera muy eficiente y útil.

REIVINDICACIONES

1. Una estructura terapéutica de fármaco-polímero que tiene una estructura de la siguiente fórmula (1) y que comprende un ligando unido a ella:

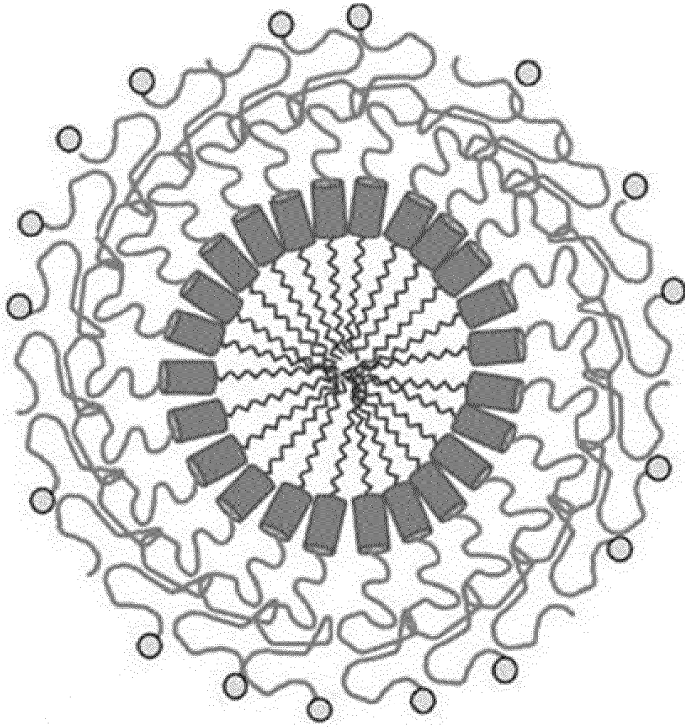
Fórmula 1 L-A-X-R-y-B

en donde A es un material hidrófilo; B es un material hidrófobo; X e y son cada uno un enlace covalente simple o un enlace covalente mediado por enlazador, independientemente el uno del otro; R es un oligo ARN de doble hélice; y L es un ligando específico del receptor que tiene la propiedad de mejorar la internalización de la célula diana por endocitosis mediada por el receptor (RME), unida covalentemente al extremo del material hidrófilo, estando dicho ligando seleccionado entre folato, N-acetilgalactosamina (NAG) y manosa.

2. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 1, en donde el oligo ARN de doble hélice comprende la modificación que comprende la sustitución de un grupo -OH en la posición de carbono 2' del resto de azúcar de uno o más nucleótidos con -CH₃ (metilo), -OCH₃, -NH₂, -F (flúor), -O-2-metoxietilo, -O-propilo, -O-2-metilietilo, -O-3-aminopropilo, -O-3-dimetilaminopropilo, -O-N-metilacetamido o -O-dimetilamidoxietilo; la sustitución de oxígeno en el resto azúcar del nucleótido por azufre; la modificación del enlace entre los nucleótidos en uno o en una combinación de dos o más seleccionados del grupo que consiste en un enlace fosforotioato, boranofosfato y metilfosfonato, o se modifica en forma de PNA (ácido nucleico peptídico) o LNA (ácido nucleico bloqueado).
3. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 1, en donde el material hidrófobo tiene un peso molecular de 250-1.000.
4. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 3, en la que el material hidrófobo se selecciona del grupo que consiste en un derivado esteroide, un derivado glicérido, glicerol éter, polipropilenglicol, un hidrocarburo C₁₂-C₅₀ insaturado o saturado, diacilfosfatidilcolina, ácido graso, fosfolípido y lipopolamina.
5. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 4, en donde el derivado esteroide se selecciona del grupo que consiste en colesterol, colestanol, ácido cólico, formato de colesterol, formato de colestanoilo y colestanoilo amina.
6. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 4, en donde el derivado de glicérido se selecciona entre los mono, di y tri-gliceridos.
7. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 1, en donde el material hidrófilo tiene un peso molecular de 200-10.000.
8. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 7, en donde el material hidrófilo se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polivinilpirrolidona y polioxazolina.
9. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 1, en donde el enlace covalente es un enlace no degradable o un enlace degradable.
10. La estructura terapéutica de fármaco-polímero de la reivindicación 9, en donde los enlaces no degradables son un enlace amida o un enlace fosfato o en donde el enlace degradable se selecciona del grupo que consiste en un enlace disulfuro, un enlace degradable por ácido, un enlace éster, un enlace anhídrido, un enlace biodegradable o un enlace degradable enzimáticamente.
11. Un procedimiento para preparar una estructura de oligo ARN de doble hélice conjugada con ligando, comprendiendo el procedimiento los pasos de:
 (1) sintetizar un ARN monocatenario sobre un soporte sólido que tenga unido a él un material hidrófilo de grupo funcional;
 (2) unir covalentemente un material hidrófobo al extremo 5' del ARN monocatenario, que tenga unido a él el material hidrófilo de grupo funcional en;
 (4) separar del soporte sólido la estructura de grupo funcional-ARN-polímero y un ARN monocatenario complementario sintetizado por separado;
 (5) unir covalentemente un ligando al extremo del material hidrófilo por medio del grupo funcional; y
 (6) hibridar la estructura de polímero-ARN unido al ligando con el ARN monocatenario complementario para formar una estructura de ARN de doble cadena, en donde el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos de la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos del receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).

12. Un procedimiento para preparar una estructura de oligo ARN de doble hélice, comprendiendo el procedimiento los pasos de:
- 5 (1) sintetizar un ARN monocatenario sobre un soporte sólido;
 (2) unir covalentemente un material hidrófilo al extremo 5' del ARN monocatenario;
 (3) unir covalentemente un ligando al extremo del material hidrófilo unido al ARN monocatenario;
 (4) separar del soporte sólido la estructura de polímero hidrófilo-ARN unida a ligando y una estructura de polímero hidrófobo-ARN complementario sintetizada por separado; y
 (5) hibridar la estructura de polímero hidrófilo-ARN unida a ligando con la estructura de polímero hidrófobo-ARN complementario para formar una estructura de doble cadena,
- 10 en donde el procedimiento de preparación comprende, entre los pasos (1) y (4), un paso de sintetizar un ARN monocatenario complementario al ARN monocatenario del paso (1), y después unir covalentemente un material hidrófobo al ARN monocatenario sintetizado para sintetizar una estructura de polímero hidrófobo-ARN monocatenario, en donde el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos de la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos del receptor, que específicamente se unen a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).
- 15
13. Un procedimiento para preparar una estructura de oligo ARN de doble hélice unida a ligando, comprendiendo el procedimiento los pasos de:
- 20 (1) sintetizar un ARN monocatenario sobre un soporte sólido que tenga un grupo funcional unido a él;
 (2) unir covalentemente un material hidrófilo al material obtenido en el paso (1);
 (3) unir covalentemente un ligando al material obtenido en el paso (2), en donde el ligando se une al extremo del material hidrófilo;
 (4) separar del soporte sólido el material obtenido en el paso (3);
 (5) unir covalentemente un material hidrófobo al material resultante del paso (4) por medio del grupo funcional unido al extremo 3'; y.
- 25 (6) hibridar el material resultante del paso (5) con un ARN monocatenario complementario para formar una estructura de ARN de doble cadena, en donde el ligando se selecciona entre anticuerpos específicos de la diana, aptámeros, péptidos y materiales químicos específicos del receptor, que se unen específicamente a una diana y realizan endocitosis mediada por el receptor (RME).
- 30
14. Una nanopartícula que comprende la estructura de fármaco terapéutico-polímero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
- 35
15. Una composición farmacéutica que comprende la estructura de fármaco terapéutico-polímero de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o la nanopartícula de la reivindicación 14.

Fig.1



; Estructura de oligo ARN de doble hélice

; Material hidrófobo

; Oligo ARN de doble hélice

; Material hidrófilo

; Ligando orientado hacia la diana

Fig 2 A, B

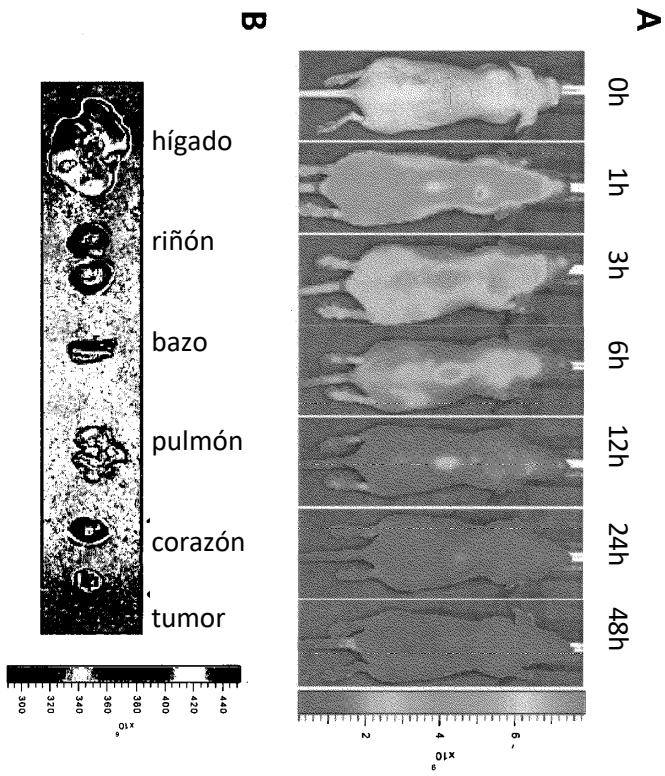


Fig 3

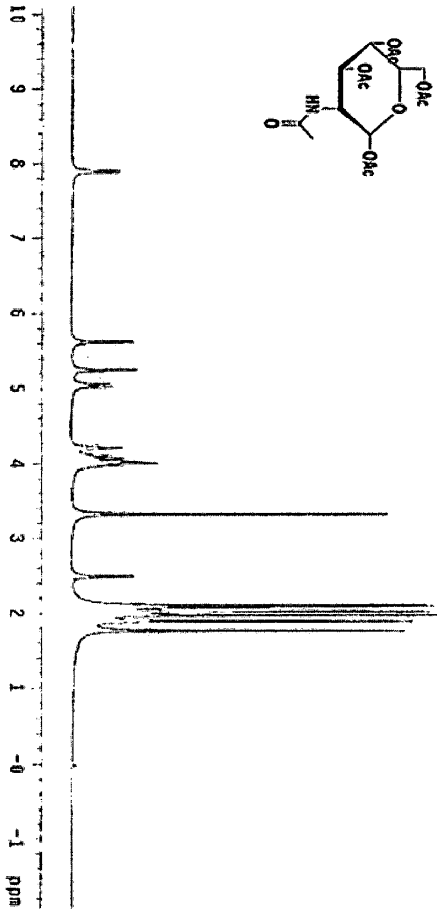


Fig 4

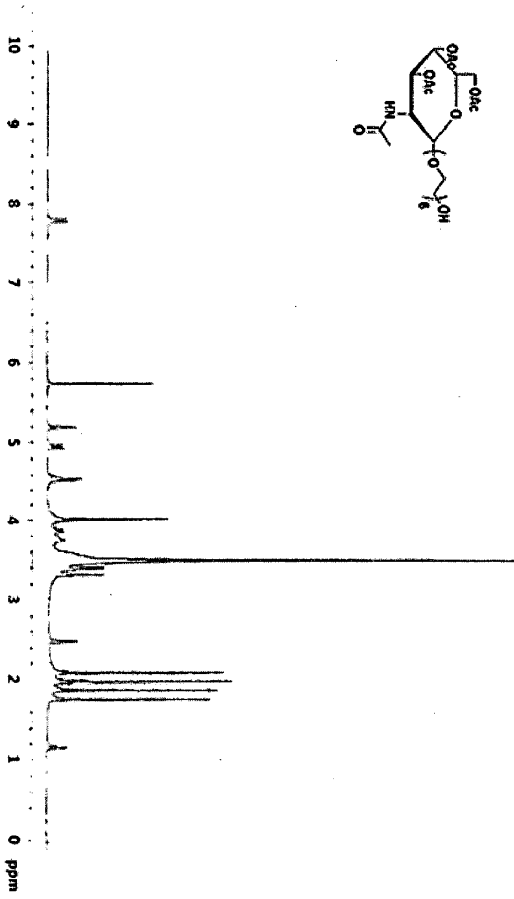


Fig 5 A, B

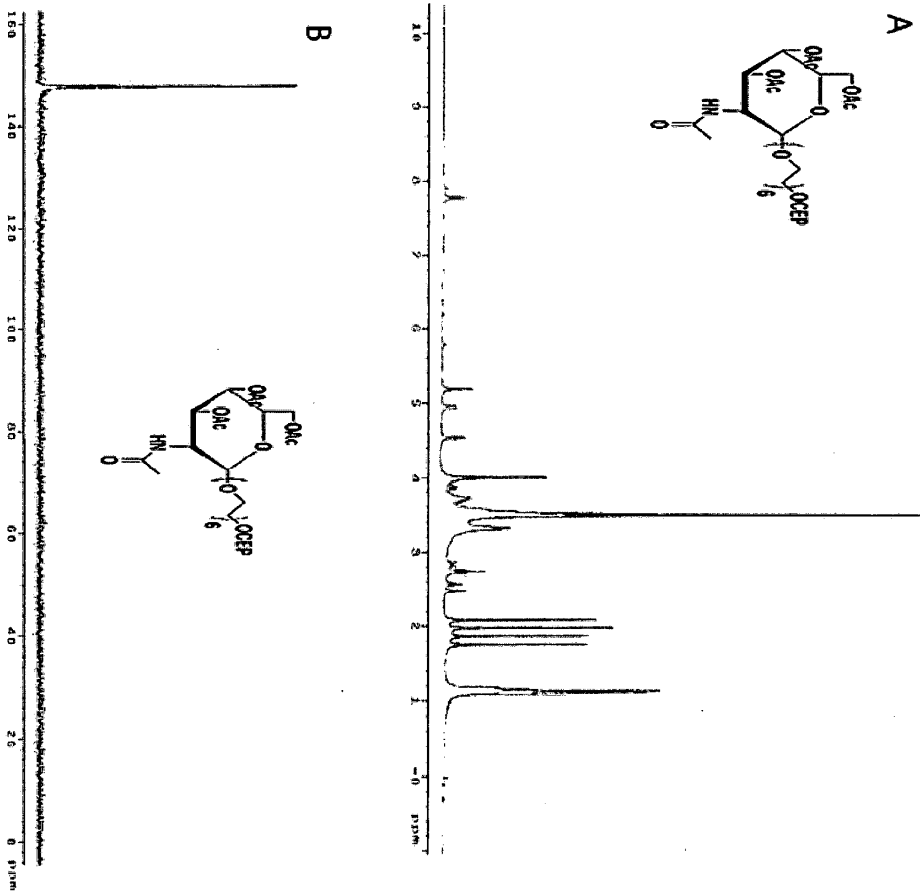
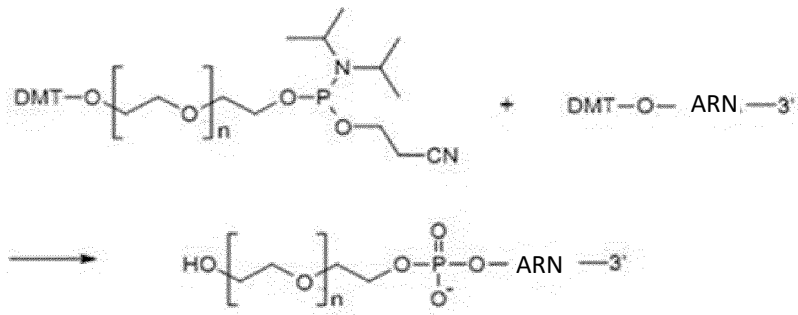
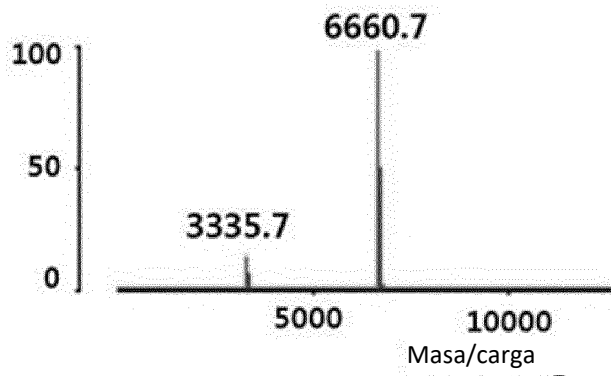


Fig.7

A



B



C

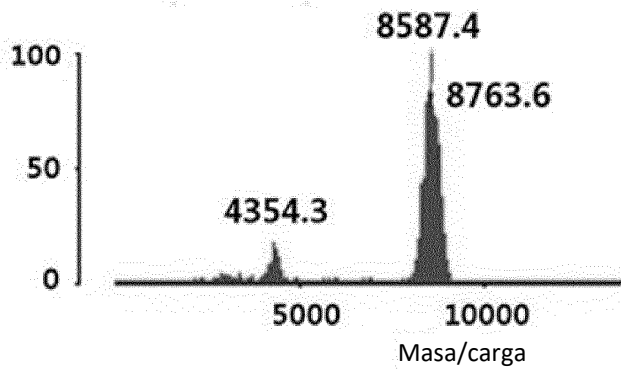


Fig. 8

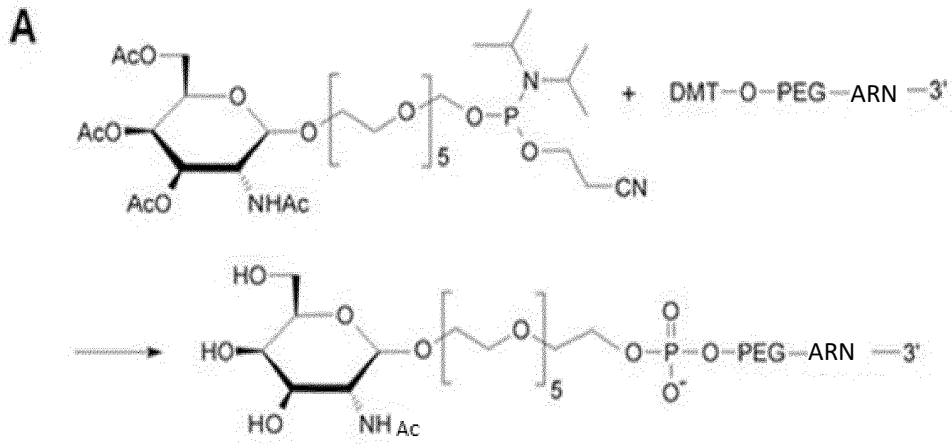


Fig 8 B

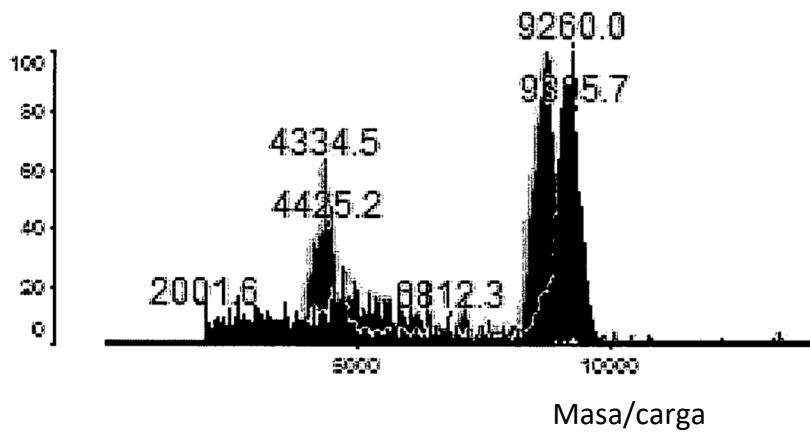


Fig.11

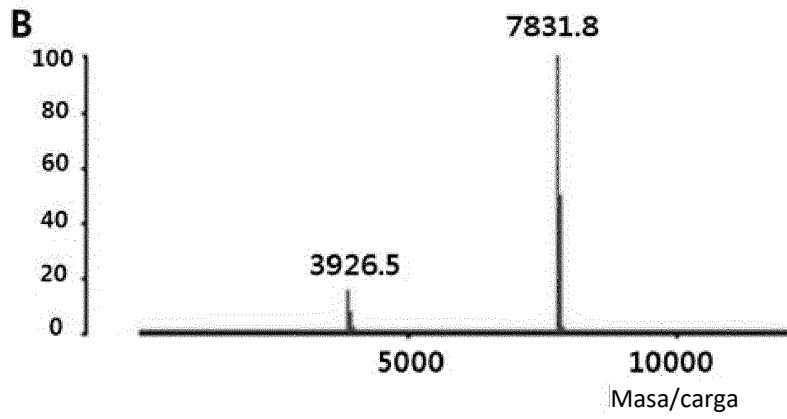
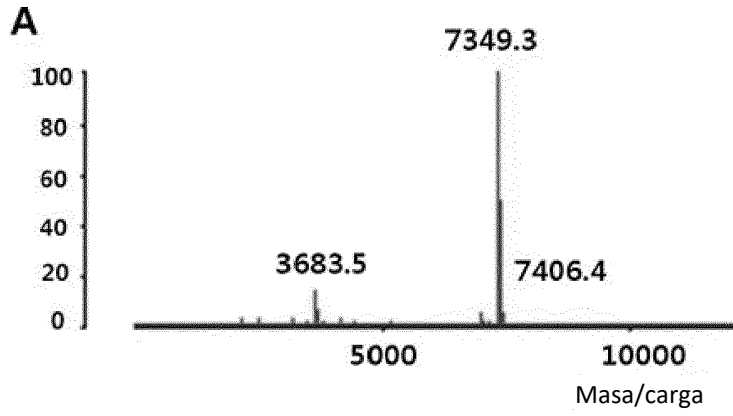


Fig. 12

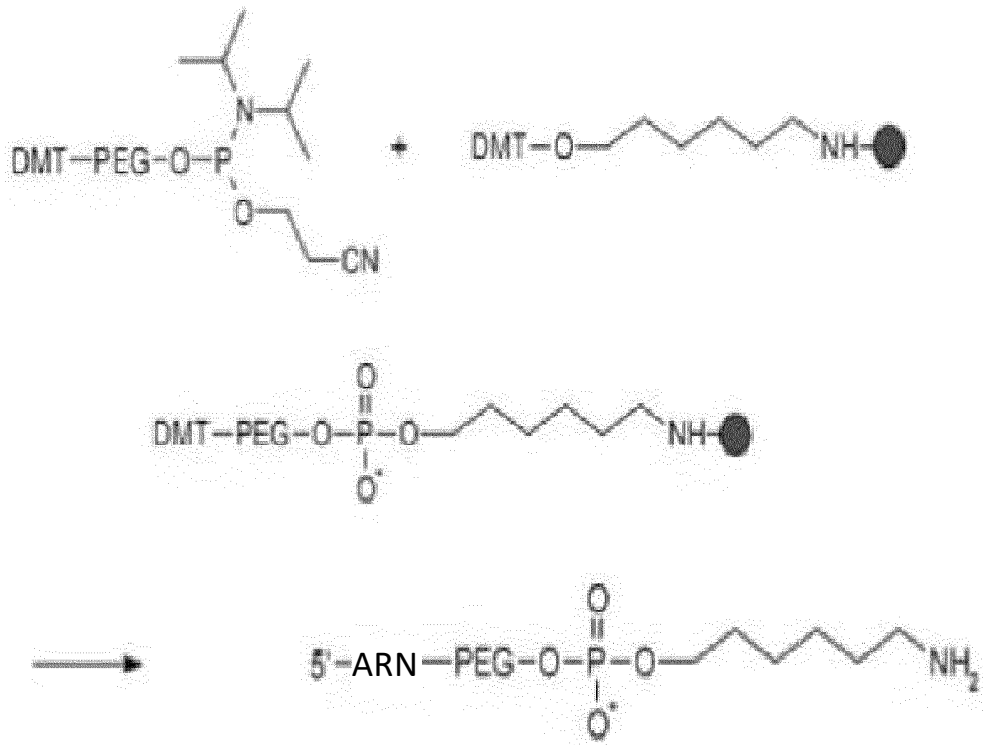


Fig 13

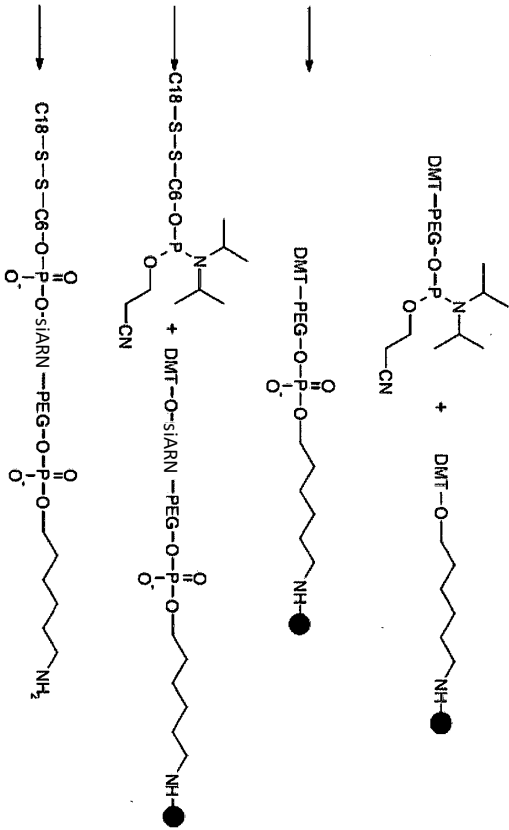


Fig 14

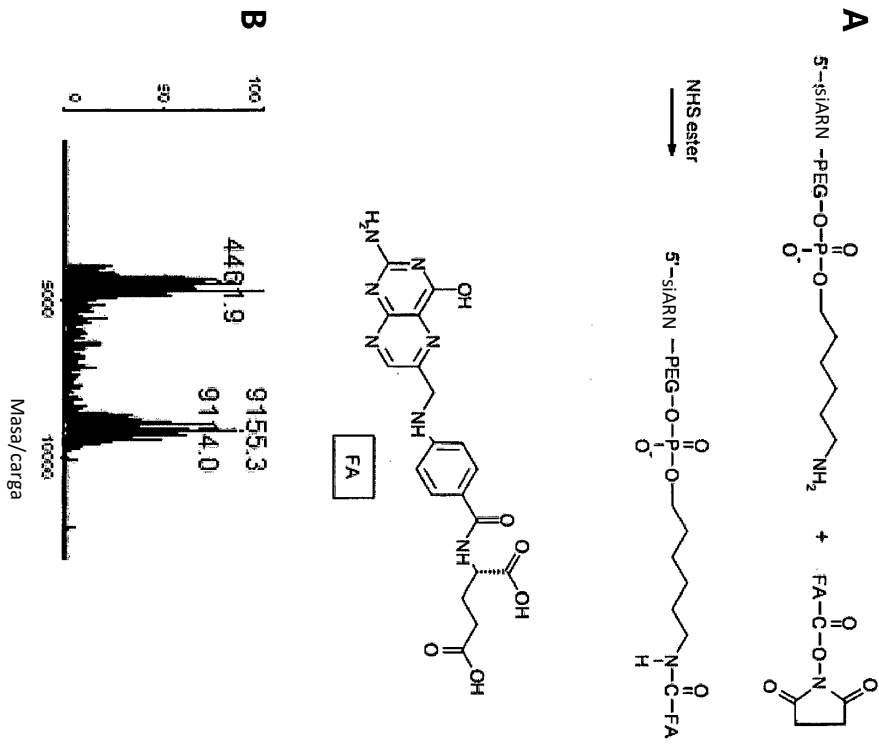


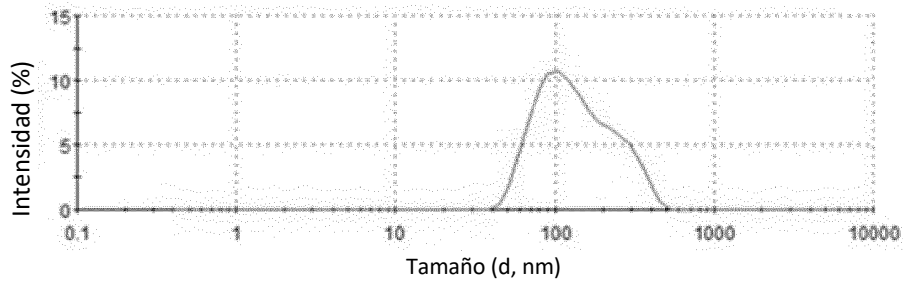
Fig.15

A

	Diam. (nm)	% Intensidad	Ancho (nm)
Media Z/d.nm): 210:1	Pico 1: 152,6	100,0	86,29
Pd: 0,392	Pico 2: 0,000	0,0	0,000
Intercep.: 0,979	Pico 3: 0,000	0,0	0,000

Resultado de calidad: consúltese el informe de calidad

Distribución de tamaños por intensidad



Registro 1129;folato-SAMi(sur584)_5 ug/ml 5

B

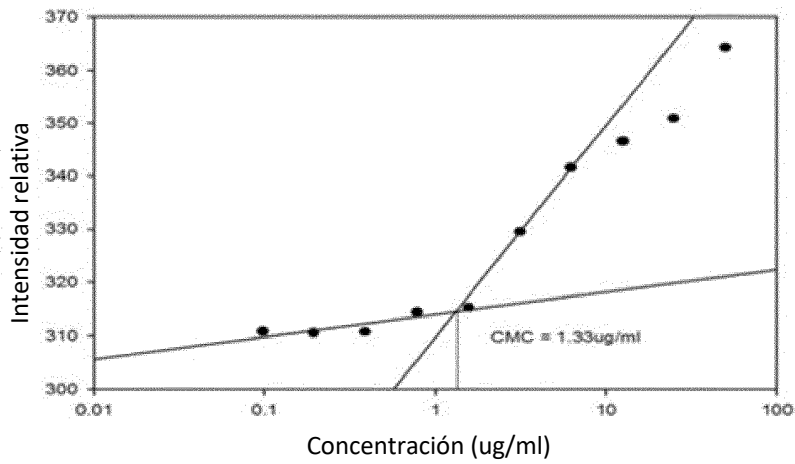


Fig.16

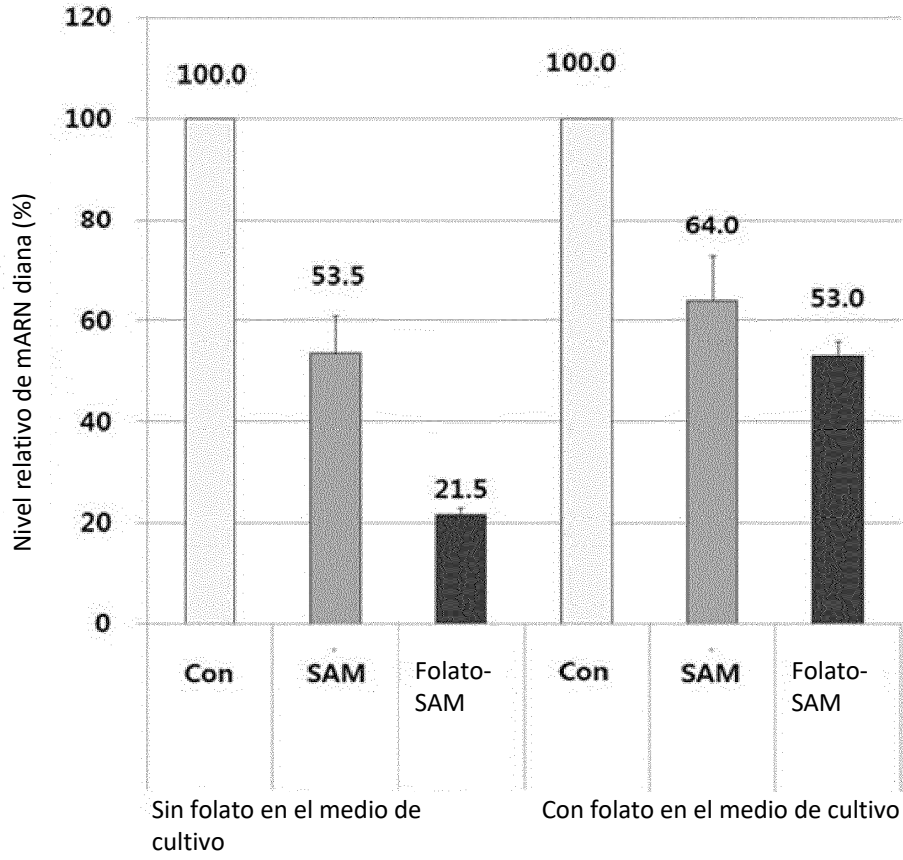


Fig.17

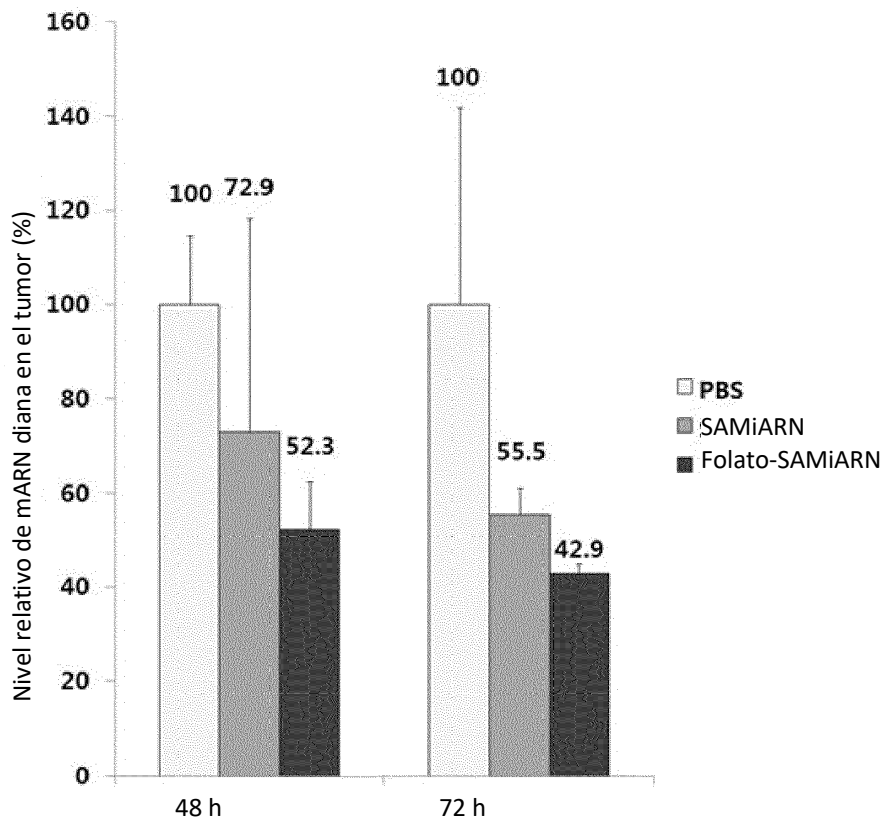


Fig.18

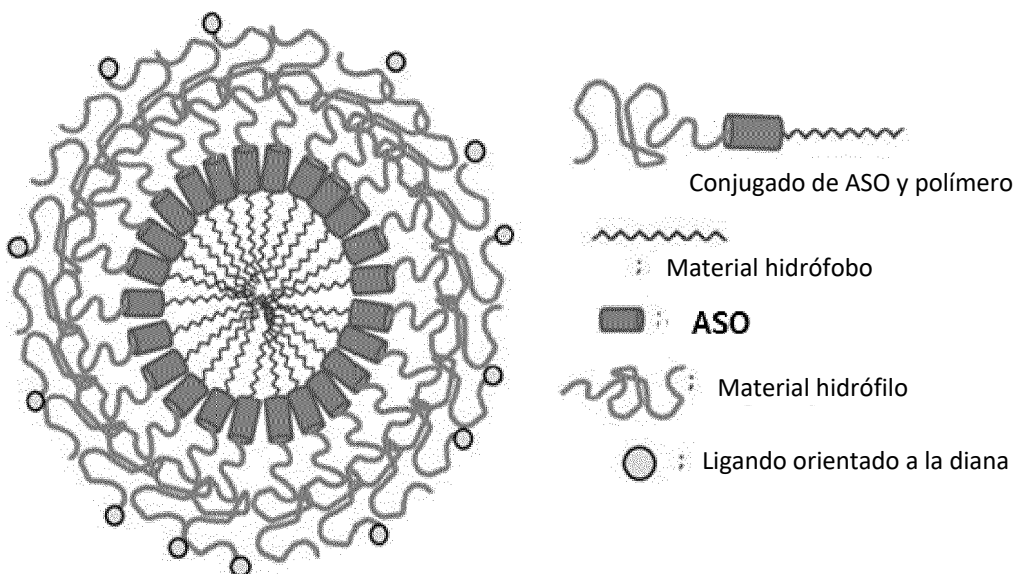


Fig 19

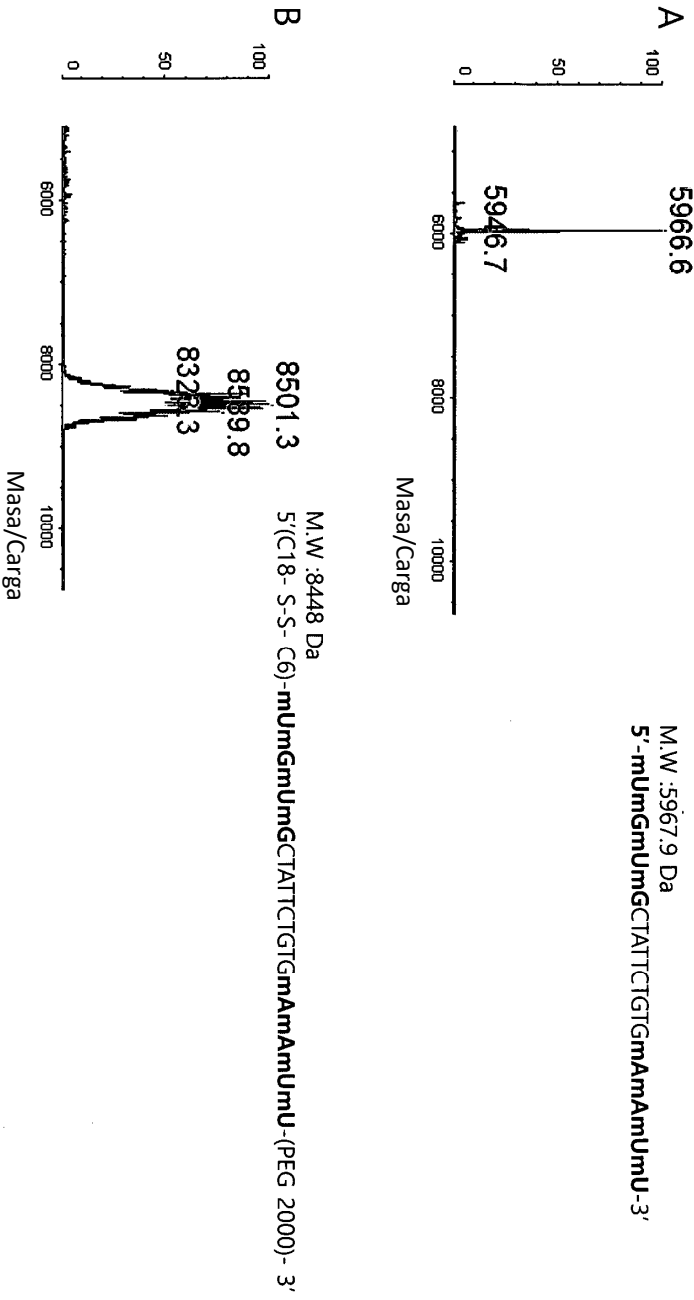


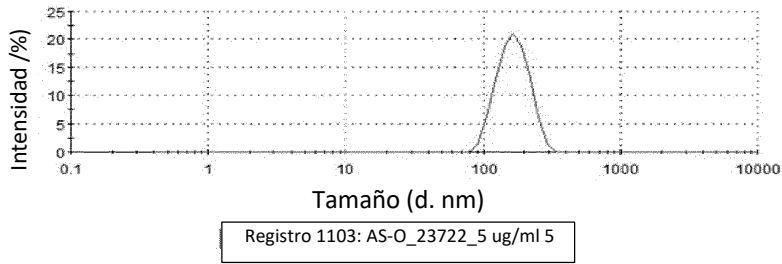
Fig. 20

A

	Diam. (nm)	% Intensidad	Ancho (nm)
Media Z /d.nm): 168,5	Pico 1: 169,6	100,0	43,14
Pd: 0,387	Pico 2: 0,000	0,0	0,000
Intercep.: 0,906	Pico 3: 0,000	0,0	0,000

Resultado de calidad: consúltese el informe de calidad

Distribución de tamaños por intensidad



B

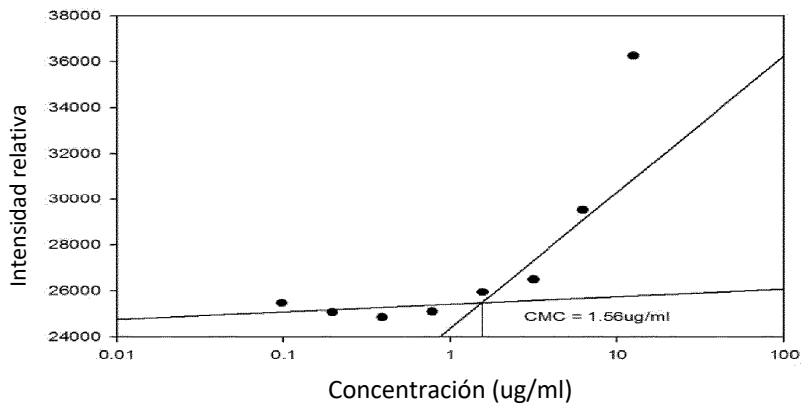


Fig. 21

