

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 908 978**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/113** (2010.01)

**C12N 15/87** (2006.01)

**A61K 47/64** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011 E 18182352 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.02.2022 EP 3406730**

54 Título: **Nuevas entidades químicas simples y métodos para la administración de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

**31.08.2010 US 37860910 P**

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

**04.05.2022**

73 Titular/es:

**SIRNA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)  
300 Third Street  
Cambridge MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**COLLETTI, STEVEN L.;  
GOSSELIN, FRANCIS;  
JADHAV, VASANT R.;  
SHAW, ANTHONY W.;  
TELLERS, DAVID M.;  
TUCKER, THOMAS J.;  
YUAN, YU y  
ZEWGE, DANIEL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 908 978 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

Nuevas entidades químicas simples y métodos para la administración de oligonucleótidos

La presente invención se refiere a composiciones modulares que comprenden un siRNA y uno o más péptidos que están unidos al siRNA a través de uno o más conectores.

5 Los esfuerzos científicos centrados en la administración sistémica de oligonucleótidos con fines terapéuticos son continuos. Tres enfoques destacados para la administración de oligonucleótidos incluyen 1) encapsulación en nanopartículas lipídicas (LNP), 2) conjugación con polímeros y 3) conjugación química simple. La conjugación química simple normalmente emplea un ligando direccionador o un lípido o un grupo solubilizante o un péptido endosomolítico o un péptido de penetración celular y/o una combinación de dos o los cuatro unidos a un oligonucleótido. Los conectores  
10 pueden estar presentes en el conjugado así como en otras funcionalidades. Se conocen conjugados químicos simples y la unión del oligonucleótido se produce en el extremo 5' o 3' del oligonucleótido, en ambos extremos, o internamente. Véase WO2005/041859; WO2008/036825, WO2009/126933, US2010/0076056 y WO2010/039548.

15 En este contexto, Gaglione y Messere (Gaglione, M. y Messere, A.; Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 10; 2010; págs. 578-595) describe siRNA modificados químicamente con perfiles de aplicación mejorados. Además, WO 2010/039548 A2 describe compuestos y procesos para conjugar ligandos con oligonucleótidos, así como conjugados respectivos y usos de los mismos. Es más, WO 2007/069068 A2 describe conjugados de péptido de penetración celular-ácido nucleico y usos de los mismos. Más aún, WO 2008/109105 A2 describe composiciones de RNA bicatenario conectado, modificado químicamente, y usos de las mismas. Finalmente, WO 2004/090105 A2 describe métodos y composiciones para realizar interferencia de RNA, usando siRNA estabilizados.

20 Una cantidad considerable de evidencia bibliográfica respalda la hipótesis de que los principales obstáculos para la administración de oligonucleótidos son la captación celular y el escape endosómico. Para mejorar la eficacia de la administración, pueden ser necesarios péptidos promotores de la captación y/o péptidos endosomolíticos y/o grupos protectores de carga en una topología muy condensada. En este sentido, las plataformas multifuncionales y las modificaciones internas ofrecen oportunidades únicas para cumplir con este requisito.

25 La presente invención se refiere a los siguientes apartados:

1. Una composición modular que comprende

1) un siRNA;

2) uno o más conectores, que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de la Tabla 2, donde los conectores  
30 están unidos a la hebra guía del siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa excluyendo las posiciones terminales 3' y/o 5' de la hebra guía, o donde los conectores están unidos a la hebra retardada del siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa excluyendo las posiciones terminales 3' y/o 5' de la hebra retardada; y

3) uno o más péptidos, que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de SEQ ID NO: 28, 29, 33, 36, 40, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 y 59, en donde los péptidos están unidos a los conectores.

35 2. La composición modular según el apartado 1 que comprende además colesterol, en la que el colesterol está unido al siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa o en la posición 3' del siRNA.

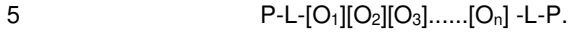
3. La composición modular según el apartado 1 que comprende además colesterol, en la que el colesterol está unido al siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa y/o en las posiciones terminales 3' y/o 5' del siRNA.

Las figuras muestran:

- 40 Fig. 1 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C4-1.  
Fig. 2 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C4-5.  
Fig. 3 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C4-8.  
Fig. 4 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C4-10.  
Fig. 5 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C6-1.  
Fig. 6 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C6-2.  
45 Fig. 7 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C7-1.  
Fig. 8 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C8-1.  
Fig. 9 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C10-7.  
Fig. 10 Niveles de mRNA de SSB en células HeLa tratadas con el compuesto C10-8.  
Fig. 11 Niveles de mRNA de SSB en retina de rata.

Para ilustrar la invención a través de representaciones gráficas, aquí se muestra una composición modular que comprende un oligonucleótido ([O<sub>1</sub>][O<sub>2</sub>][O<sub>3</sub>].....[O<sub>n</sub>]), uno o más conectores (L), uno o más péptidos (P) y uno o más lípidos opcionales (X), uno o más ligandos direccionadores (X) y/o uno o más grupos solubilizantes (X).

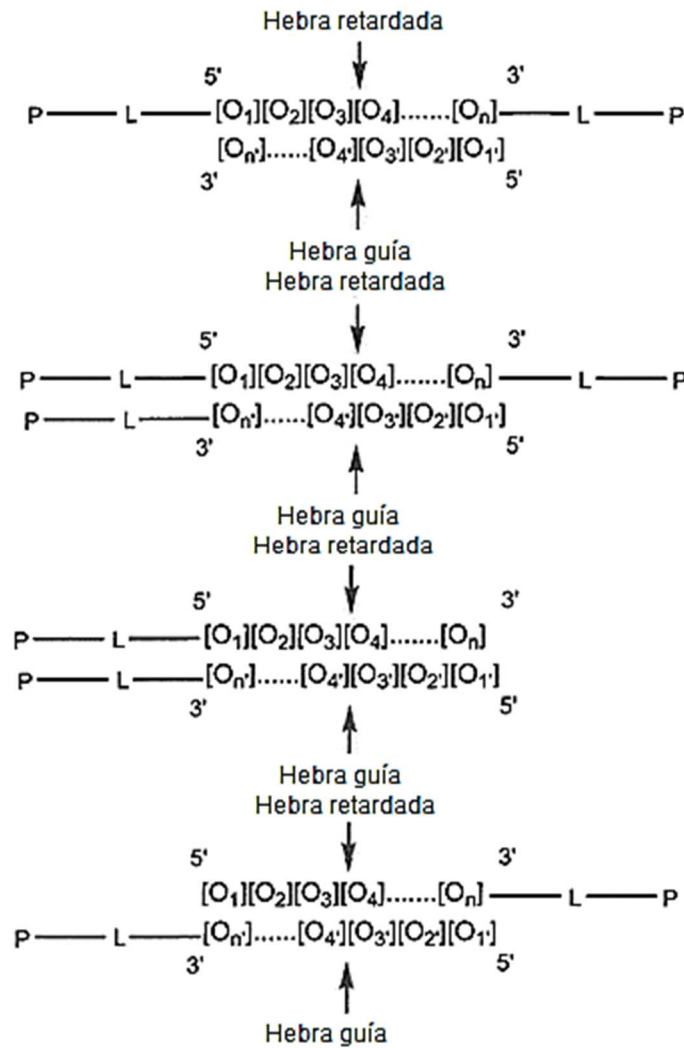
En una realización, la composición modular puede tener la fórmula:



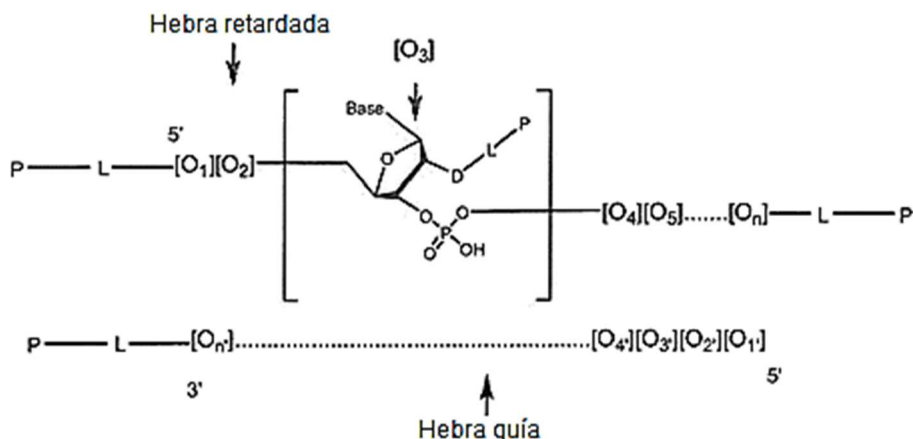
En otra realización, la composición modular puede tener la fórmula:



Ejemplos de composiciones modulares son:



Otra representación de una composición modular es:

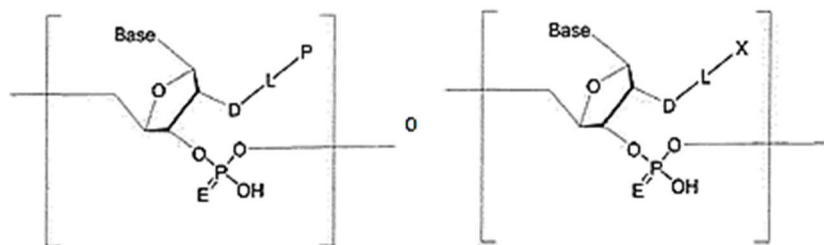


Estos ejemplos son orientativos. Un experto en la técnica reconocerá que existe una variedad de permutaciones para colocar los componentes deseados en la hebra guía y la hebra retardada.

- 5 Se puede unir al oligonucleótido cualquier número de conectores y, por lo tanto, cualquier número de péptidos. Un intervalo preferido de número de conectores es de 1 a 8. Un intervalo más preferido de número de conectores es de 1 a 4. Un intervalo preferido de número de péptidos es de 1 a 8. Un intervalo más preferido de número de péptidos es de 1 a 4.

- 10 Las dos hebras contienen  $n$  y  $n'$  nucleótidos respectivamente. Los números  $n$  y  $n'$  pueden ser iguales o diferentes. Los números son números enteros que van del 8 al 50. Preferiblemente, los números son números enteros que van del 12 al 28. Más preferiblemente, los números son números enteros que van del 19 al 21.

Como ejemplo, cada nucleótido  $[O_n]$  o  $[O'_n]$ , que contiene un conector (L-P y/o L-X) tiene estructuras genéricas que se muestran en la siguiente representación gráfica:



- 15 Para cada nucleótido, 1) E = oxígeno (O) o azufre (S); 2) Base = A, U, G o C, que puede estar modificada o no modificada; 3) D es el punto de conexión entre el anillo de ribosa y el conector L, D = oxígeno (O), azufre (S, S(O) o S(O)<sub>2</sub>), nitrógeno (N-R, donde R = H, alquilo, L-P o L-X), carbono (CH-R, donde R = H, alquilo, L-P o L-X), o fósforo (P(O)R o P(O)(OR), donde R = alquilo, L-P o L-X). Preferiblemente, D = oxígeno (O).

Los dos nucleótidos  $[O_{n-1}]$  y  $[O_n]$  o  $[O'_{n-1}]$  y  $[O'_n]$  están conectados a través de enlaces fosfodiéster o tio-fosfodiéster.

- 20 Cuando el oligonucleótido es un oligonucleótido bicatenario, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante pueden ubicarse en la misma hebra o en hebras diferentes.

En algunas realizaciones, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están en la misma hebra.

En algunas realizaciones, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están en la hebra retardada.

- 25 En algunas realizaciones, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están en la hebra guía.

En algunas realizaciones, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están ubicados en hebras diferentes.

En algunas realizaciones, el "P-L" está en la hebra retardada mientras que el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están en la hebra guía.

En algunas realizaciones, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están en hebras diferentes pero en el mismo extremo terminal del oligonucleótido bicatenario.

En algunas realizaciones, el "P-L" y el lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante están en hebras diferentes y en los extremos terminales opuestos del oligonucleótido bicatenario.

- 5 En algunas realizaciones, se puede usar un "P-L" adicional de naturaleza idéntica o diferente en lugar del lípido, el ligando direccionador y/o el grupo solubilizante indicado en las realizaciones anteriores.

En algunas realizaciones, el "P-L" se puede ubicar en múltiples extremos terminales de la hebra retardada o de la hebra guía y el lípido, el ligando de direccionamiento y/o el grupo solubilizante se pueden ubicar en los extremos terminales restantes de las hebras retardada y guía.

- 10 En algunas realizaciones, un "P-L" y dos o más lípidos, ligandos direccionadores y/o grupos solubilizantes están presentes en el oligonucleótido.

En algunas realizaciones, dos o más "P-L" y dos o más lípidos, ligandos direccionadores y/o grupos solubilizantes están presentes en el oligonucleótido.

- 15 En algunas realizaciones, cuando el oligonucleótido es un oligonucleótido bicatenario y están presentes una pluralidad de componentes "P-L" y/o lípidos, ligandos direccionadores y/o grupos solubilizantes, tal pluralidad de componentes "P-L" y/o lípidos, ligandos direccionadores y/o grupos solubilizantes pueden estar todos presentes en una hebra o en ambas hebras del oligonucleótido bicatenario.

Cuando están presentes una pluralidad de componentes "P-L" y/o lípidos, ligandos direccionadores y/o grupos solubilizantes, todos pueden ser iguales o diferentes.

- 20 En algunas realizaciones, los "P-L" están solo en los nucleótidos internos (es decir, excluyendo los extremos 3' y 5' terminales del oligonucleótido).

En el presente documento se describe un método para administrar un oligonucleótido a una célula. El método incluye (a) proporcionar u obtener una composición modular de la invención; (b) poner en contacto una célula con la composición modular; y (c) permitir que la célula incorpore la composición modular.

- 25 El método se puede realizar in vitro, ex vivo o in vivo, por ejemplo, para tratar a un sujeto identificado como necesitado de un oligonucleótido, por ejemplo, un ser humano, que necesita tener la expresión de uno o más genes, por ejemplo, un gen relacionado con un trastorno, regulada a la baja o silenciada.

- 30 En un aspecto, aquí se describe un método para inhibir la expresión de uno o más genes. El método comprende poner en contacto una o más células con una cantidad eficaz de un oligonucleótido, en el que la cantidad eficaz es una cantidad que suprime la expresión del uno o más genes. El método se puede realizar in vitro, ex vivo o in vivo.

- 35 Los métodos y composiciones descritos en este documento, por ejemplo, la composición modular descrita en este documento, se pueden usar con cualesquier oligonucleótidos conocidos en la técnica. Además, los métodos y composiciones descritos en el presente documento se pueden usar para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno conocido en la técnica y para el tratamiento de cualquier sujeto, por ejemplo, cualquier animal, cualquier mamífero, como un ser humano. Un experto normal en la técnica también reconocerá que los métodos y composiciones descritos en el presente documento pueden usarse para el tratamiento de cualquier enfermedad que se beneficiaría de la regulación a la baja o silenciamiento de uno o más genes.

- 40 Los métodos y composiciones descritos en el presente documento, por ejemplo, la composición modular descrita en el presente documento, se pueden usar con cualquier dosificación y/o formulación descrita en el presente documento, o cualquier dosificación o formulación conocida en la técnica. Además de las vías de administración descritas en el presente documento, un experto en la técnica también apreciará que se pueden usar otras vías de administración para administrar la composición modular de la invención.

#### Oligonucleótido

- 45 Un "oligonucleótido", como se usa en el presente documento, es un RNA, PNA o DNA policatenario, bicatenario o monocatenario, no modificado o modificado. Los ejemplos de RNA modificados incluyen aquellos que tienen mayor resistencia a la degradación por nucleasas que los RNA no modificados. Otros ejemplos incluyen aquellos que tienen una modificación de azúcar en 2', una modificación de base, una modificación en un saliente monocatenario, por ejemplo, un saliente monocatenario en 3' o, particularmente si es monocatenario, una modificación en 5' que incluye uno o más fosfatos. grupos o uno o más análogos de un grupo fosfato. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción adicional de los oligonucleótidos en WO2009/126933.

- 50 En una realización, un oligonucleótido es un miRNA o siRNA antisentido. El oligonucleótido preferido es un siRNA. Otro oligonucleótido preferido es la hebra retardada de un siRNA. Otro oligonucleótido preferido es la hebra guía de un siRNA. siRNA

siRNA dirige el silenciamiento específico de secuencia de mRNA a través de un proceso conocido como interferencia por RNA (RNAi). El proceso ocurre en una amplia variedad de organismos, incluidos los mamíferos y otros vertebrados. Se conocen métodos para preparar y administrar siRNA y su uso para inactivar específicamente la función génica. siRNA incluye siRNA modificado y no modificado. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción adicional de siRNA en WO2009/126933.

Se conocen varios ejemplos de rutas de administración que pueden usarse para administrar siRNA a un sujeto. Además, el siRNA se puede formular de acuerdo con cualquier ejemplo de método conocido en la técnica. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción adicional de la formulación y administración de siRNA en WO2009/126933.

#### Péptidos

Para los fármacos macromoleculares y las moléculas de fármacos hidrofílicos, que no pueden cruzar fácilmente las membranas de la bicapa, se cree que el atrapamiento en los compartimentos endosómicos/lisosómicos de la célula es el mayor obstáculo para la entrega eficaz en su sitio de acción. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que el uso de péptidos facilitará el escape de oligonucleótidos de estos compartimentos endosómicos/lisosómicos o la traslocación de oligonucleótidos a través de una membrana celular y su liberación en el compartimento citosólico. En ciertas realizaciones, los péptidos pueden ser péptidos policatiónicos, anfifílicos o polianiónicos o peptidomiméticos que muestran actividad de membrana y/o fusogenicidad dependiente del pH. Un peptidomimético puede ser una pequeña cadena similar a una proteína diseñada para mimetizar un péptido.

En algunas realizaciones, el péptido es un agente de penetración celular, preferiblemente un agente de penetración celular helicoidal. Estos péptidos se denominan comúnmente péptidos de penetración celular. Véase, por ejemplo, "Handbook of Cell Penetrating Peptides" Ed. Langel, U.; 2007, CRC Press, Boca Raton, Florida. Preferiblemente, el componente es anfipático. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que preferiblemente tiene una fase lipófila y otra lipófoba. Un agente de penetración celular puede ser, por ejemplo, un péptido de penetración celular, un péptido catiónico, un péptido anfipático o un péptido hidrofóbico, p.ej. que consiste principalmente en Tyr, Trp y Phe, un péptido dendrímero, un péptido restringido o un péptido reticulado. Los ejemplos de péptidos de penetración celular incluyen Tat, Penetratin y MPG. Para la presente invención, se cree que los péptidos que penetran en las células pueden ser un péptido de "entrega", que puede transportar moléculas polares grandes que incluyen péptidos, oligonucleótidos y proteínas a través de las membranas celulares. Los péptidos de penetración celular pueden ser lineales o cíclicos, e incluyen D-aminoácidos, secuencias "retro-inversas", enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos, miméticos de peptidilo. Además, los péptidos y los miméticos de péptidos pueden estar modificados, p.ej. glicosilados, pegilados o metilados. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción más detallada de los péptidos en WO2009/126933.

Los péptidos pueden conjugarse en cualquiera de los extremos o en ambos extremos mediante la adición de una cisteína u otro resto que contiene tiol al extremo C- o N-terminal. Cuando no están funcionalizados en el extremo N-terminal, los péptidos pueden rematarse con un grupo acetilo o pueden rematarse con un lípido, un PEG o un resto direccionador. Cuando el extremo C-terminal de los péptidos no está conjugado o funcionalizado, se puede rematar como una amida o se puede rematar con un lípido, un PEG o un resto direccionador.

Los péptidos descritos en este documento son:

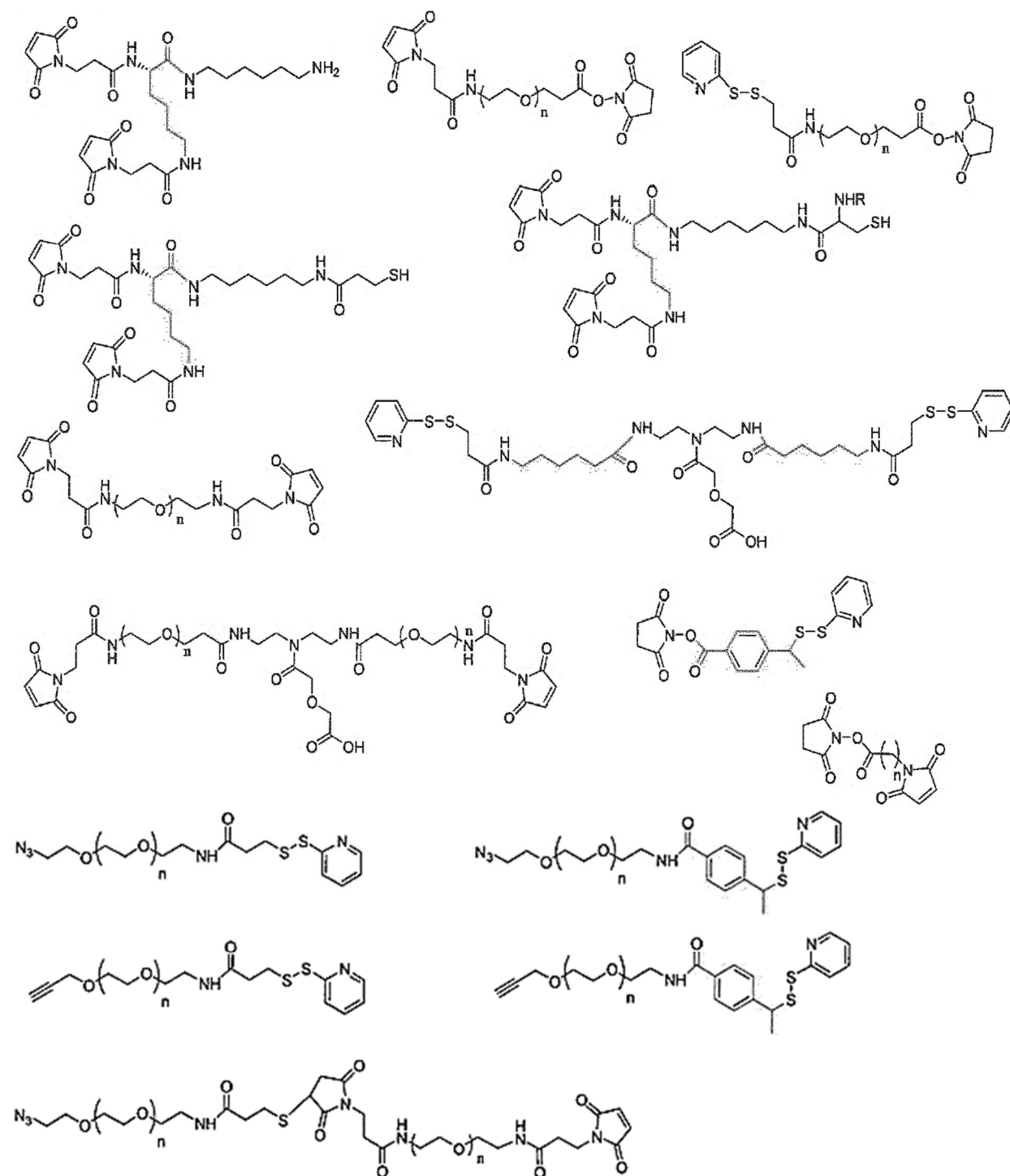
HFHHFFHHFFHHFFHHFFHHF (SEQ ID NO: 1);  
 WHHWWWHWWHHWWHHW (SEQ ID NO: 2);  
 40 HWHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 3);  
 HLHHLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 4);  
 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 5);  
 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 6);  
 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 7);  
 45 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 8);  
 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 9);  
 HPHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 10);  
 HLHPLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 11);  
 HLHPLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 12);  
 50 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 13);  
 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHL (SEQ ID NO: 14);  
 HLHLLHLLHLLHLLHLLHHP (SEQ ID NO: 15);

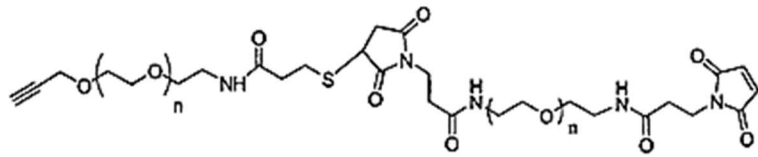




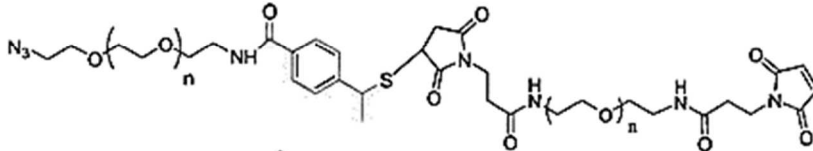
Los conectores descritos en este documento se muestran en la Tabla 1:

Tabla 1

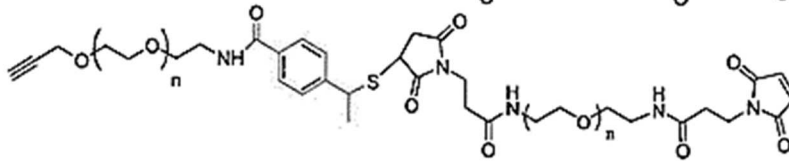




R = H, Boc, Cbz, Ac, PEG, lípido,  
ligando direccionador, conector(es)  
y/o péptido(s).

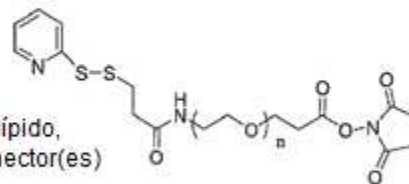
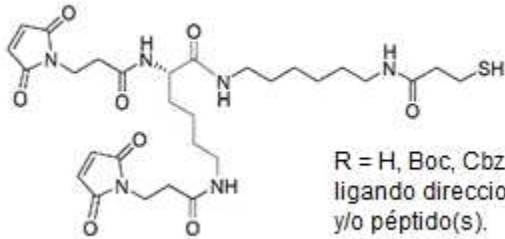
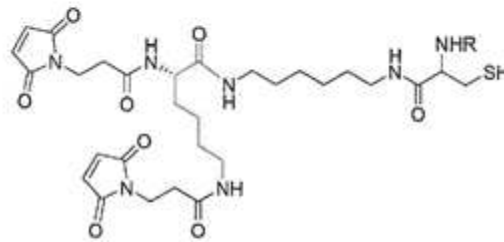
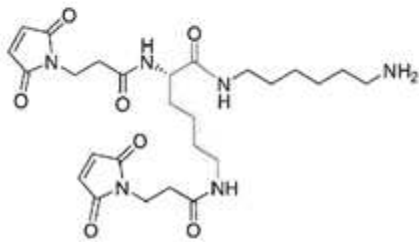
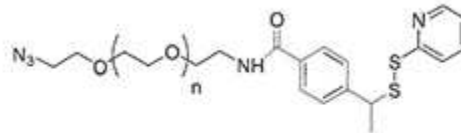
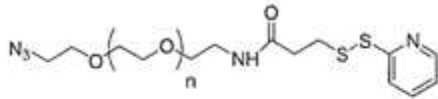


n = 0 a 750



Los conectores preferidos se muestran en la Tabla 2:

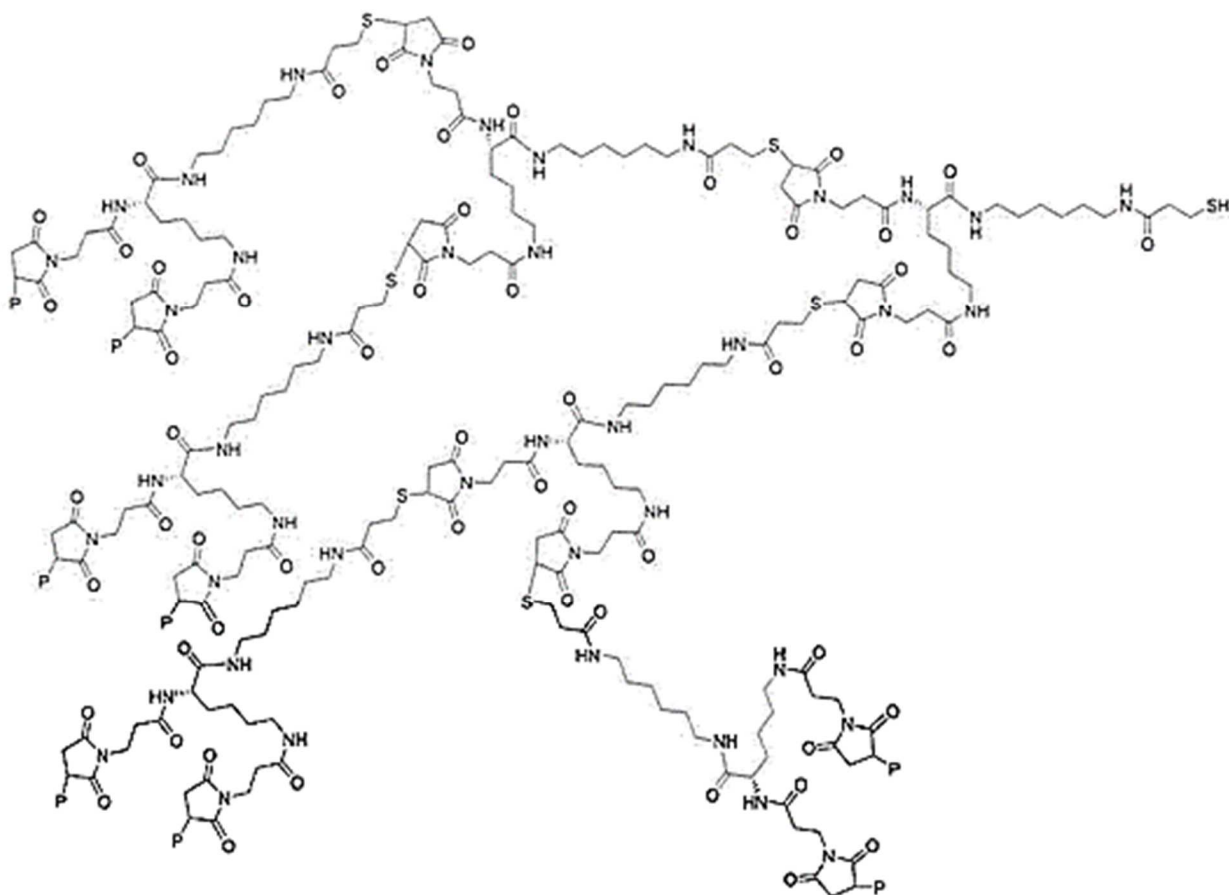
Tabla 2



R = H, Boc, Cbz, Ac, PEG, lípido,  
ligando direccionador, conector(es)  
y/o péptido(s).

n = 0 a 750

- 5 Los conectores comerciales están disponibles a partir de varios proveedores tales como Pierce o Quanta Biodesign que incluyen combinaciones de dichos conectores. Los conectores también se pueden combinar para producir arquitecturas ramificadas más complejas que acomodan de 1 a 8 péptidos, como se ilustra en uno de estos ejemplos a continuación:



#### Ligandos direccionadores

Las composiciones modulares descritas en el presente documento pueden comprender un ligando direccionador. En algunas realizaciones, este ligando direccionador puede dirigir la composición modular a una célula particular. Por ejemplo, el ligando direccionador puede unirse de forma específica o no específica con una molécula en la superficie de una célula objetivo. El resto direccionador puede ser una molécula con una afinidad específica por una célula objetivo. Los restos direccionadores pueden incluir anticuerpos dirigidos contra una proteína que se encuentra en la superficie de una célula diana, o el ligando o una porción de unión al receptor de un ligando para una molécula que se encuentra en la superficie de una célula diana. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción adicional de ligandos direccionadores en WO2009/126933.

Los ligandos direccionadores se seleccionan del grupo que consiste en un anticuerpo, una porción de unión a ligando de un receptor, un ligando para un receptor, un aptámero, D-galactosa, N-acetil-D-galactosa (GalNAc), N-acetil-D-galactosa multivalente, D-manosa, colesterol, un ácido graso, una lipoproteína, folato, tirotropina, melanotropina, proteína surfactante A, mucina, carbohidrato, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fructosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, transferina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, una fracción lipófila que mejora la unión a proteínas plasmáticas, un esteroide, ácido biliar, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, un mimético del péptido RGD, ibuprofeno, naproxeno, aspirina, folato y análogos y derivados de los mismos.

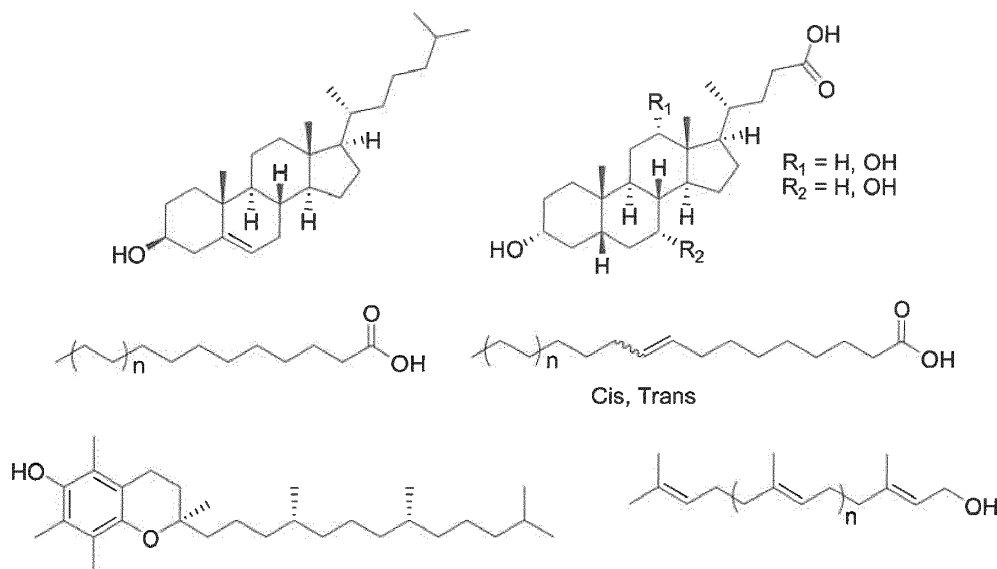
Los ligandos direccionadores preferidos se seleccionan del grupo que consiste en un péptido RGD, un mimético del péptido RGD, D-galactosa, N-acetil-D-galactosamina (GalNAc), GalNAc<sub>2</sub> y GalNAc<sub>3</sub>, colesterol, folato, y análogos y derivados de los mismos.

#### Lípidos

Los restos lipófilos, como el colesterol o los ácidos grasos, cuando se unen a moléculas altamente hidrófilas, como los ácidos nucleicos, pueden mejorar sustancialmente la unión a proteínas plasmáticas y, en consecuencia, la semivida en circulación. Además, los grupos lipófilos pueden aumentar la captación celular. Por ejemplo, los lípidos pueden unirse a ciertas proteínas plasmáticas, como las lipoproteínas, que, en consecuencia, se ha demostrado que aumentan la captación en tejidos específicos que expresan los receptores de lipoproteínas correspondientes (p. ej., el receptor de LDL o el receptor eliminador SR-B1). Los conjugados lipófilos también se pueden considerar como un enfoque de administración dirigida y su tráfico intracelular podría mejorarse potencialmente mediante la combinación con agentes endosomolíticos.

Ejemplos de restos lipofílicos que mejoran la unión a proteínas plasmáticas incluyen, entre otros, esteroides, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocolico, dialquilglicéridos, diacilglicérido, fosfolípidos, esfingolípidos, ácido adamantano acético, ácido 1-pirenobutírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleoil)litocólico, ácido O3-(oleoil)colénico, dimetoxitritilo, fenoxazina, aspirina, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E y biotina, etc. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción adicional de los lípidos en WO2009/126933.

Ejemplos de lípidos incluyen:



10

El lípido preferido es el colesterol.

#### Agentes Solubilizantes

La composición modular puede comprender uno o más restos/ligandos que pueden mejorar la solubilidad acuosa, la semivida en circulación y/o la captación celular. Estos pueden incluir sustancias naturales, como una proteína (p. ej., albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL) o globulina); o un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico). Estos restos también pueden ser una molécula recombinante o sintética, como un polímero sintético o poliaminoácidos sintéticos. Los ejemplos incluyen polilisina (PLL), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), copolímero de estireno-anhídrido de ácido maleico, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero de divinil éter-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG, por ejemplo, PEG-0.5K, PEG-2K, PEG-5K, PEG-10K, PEG-12K, PEG-15K, PEG-20K, PEG-40K), metil-PEG (mPEG), [mPEG]<sub>2</sub>, poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida, o polifosfazina. Se pueden encontrar ejemplos y una descripción adicional de los agentes solubilizantes en WO2009/126933.

El grupo solubilizante preferido es PEG de 0,5K a 30K.

#### Método de tratamiento

En el presente documento se describe un método para tratar a un sujeto en riesgo o afectado por una enfermedad que puede beneficiarse de la administración de la composición modular de la invención. El método comprende administrar la composición modular de la invención a un sujeto que lo necesita, tratando así al sujeto. El oligonucleótido que se administra dependerá de la enfermedad que se ha de tratar. Por ejemplo, los conjugados de la presente invención son útiles para el tratamiento del cáncer. Véase WO2009/126933 para obtener detalles adicionales sobre los métodos de tratamiento para indicaciones específicas.

#### Formulación

Existen numerosos métodos para preparar conjugados de compuestos de oligonucleótidos. Los expertos en la materia estarán familiarizados con esas técnicas. Una referencia útil para tales reacciones es Bioconjugate Techniques, Hermanson, G.T., Academic Press, San Diego, CA, 1996. Otras referencias incluyen WO2005/041859; WO2008/036825 y WO2009/126933.

#### Ejemplos

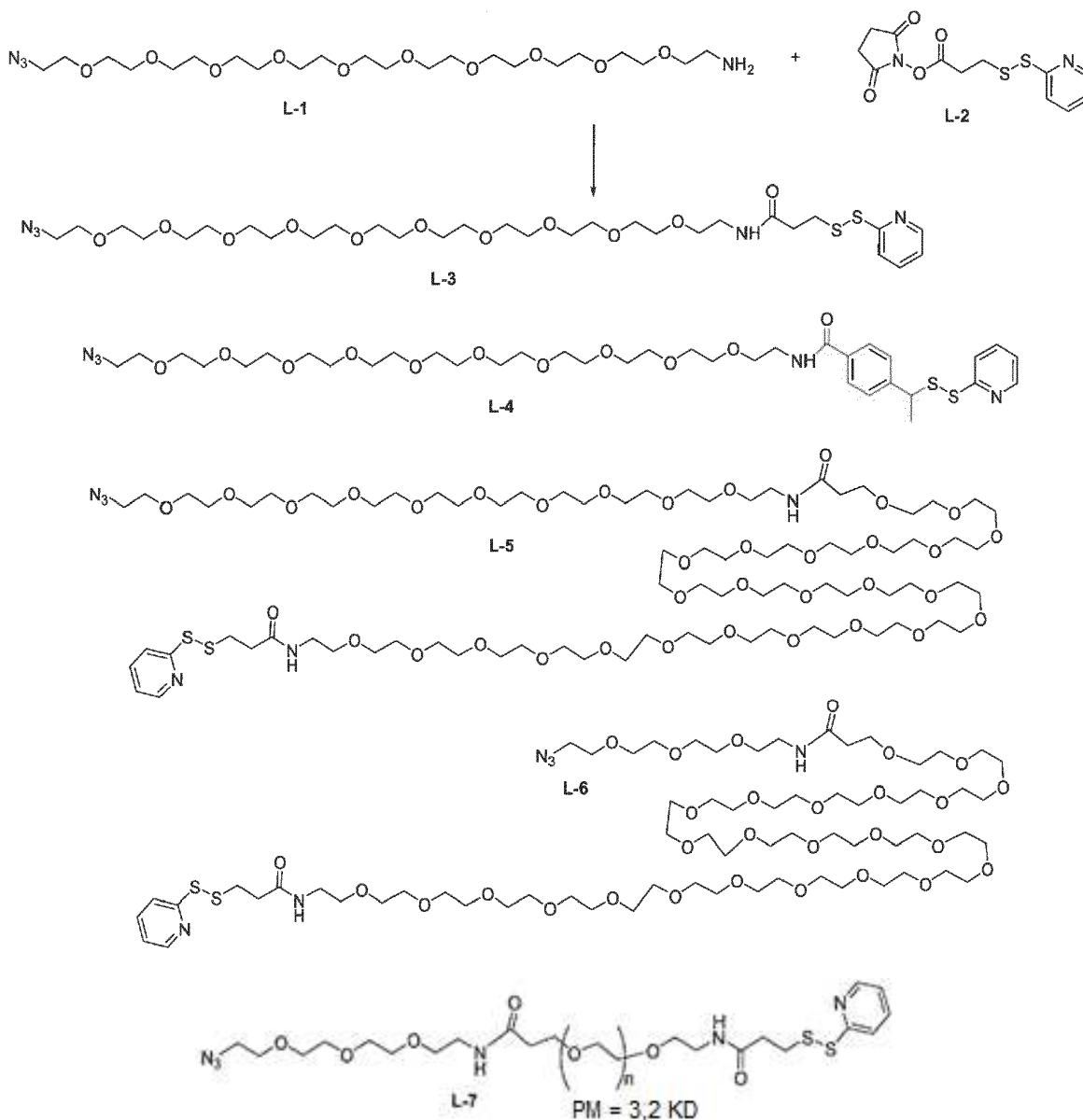
La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional. Los siRNA descritos en el presente documento se diseñaron para dirigirse al gen SSB expresado

de forma ubicua (antígeno B del síndrome de Sjogren; NM\_009278.4).

La síntesis de oligonucleótidos es bien conocida en la técnica. (Véanse las solicitudes de patentes de EE. UU.: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 y US 2009/0285881 y solicitudes de patente PCT: WO 2009/086558, WO2009/127060, WO2009/132131, WO2010/042877, WO2010/054384, WO2010/054401, WO2010/054405 y WO2010/054406). Los siRNA descritos y utilizados en los Ejemplos se sintetizaron mediante procedimientos estándar en fase sólida.

Los grupos conectores pueden estar conectados a la(s) hebra(s) de oligonucleótidos en un punto de unión de enlace (LAP, por sus siglas en inglés) y pueden incluir cualquier resto que contiene carbono, en algunas realizaciones que tienen al menos un átomo de oxígeno, al menos un átomo de fósforo y/o al menos un átomo de nitrógeno. En algunas realizaciones, el átomo de fósforo forma parte de un grupo fosfato o fosforiato terminal en el grupo conector, que puede servir como punto de conexión para la hebra de oligonucleótidos. En determinadas realizaciones, el átomo de nitrógeno forma parte de un grupo terminal éter, éster, amino o amido (NHC(O)-) en el grupo conector, que puede servir como punto de conexión para los conectores de interés, la unidad endosomolítica, el péptido de penetración celular, el grupo solubilizante, el lípido, el grupo direccionador o conectores adicionales de interés. Estos grupos de conectores terminales incluyen, pero no se limitan a, un resto hexilo C<sub>6</sub>, hidroxilo secundario C<sub>5</sub>, tiol C<sub>3</sub> o resto tiol C<sub>6</sub>. Un ejemplo de las secuencias de RNA descritas a continuación es hexilo C<sub>6</sub>: [(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub> NH<sub>2</sub>].

Ejemplo 1



## ES 2 908 978 T3

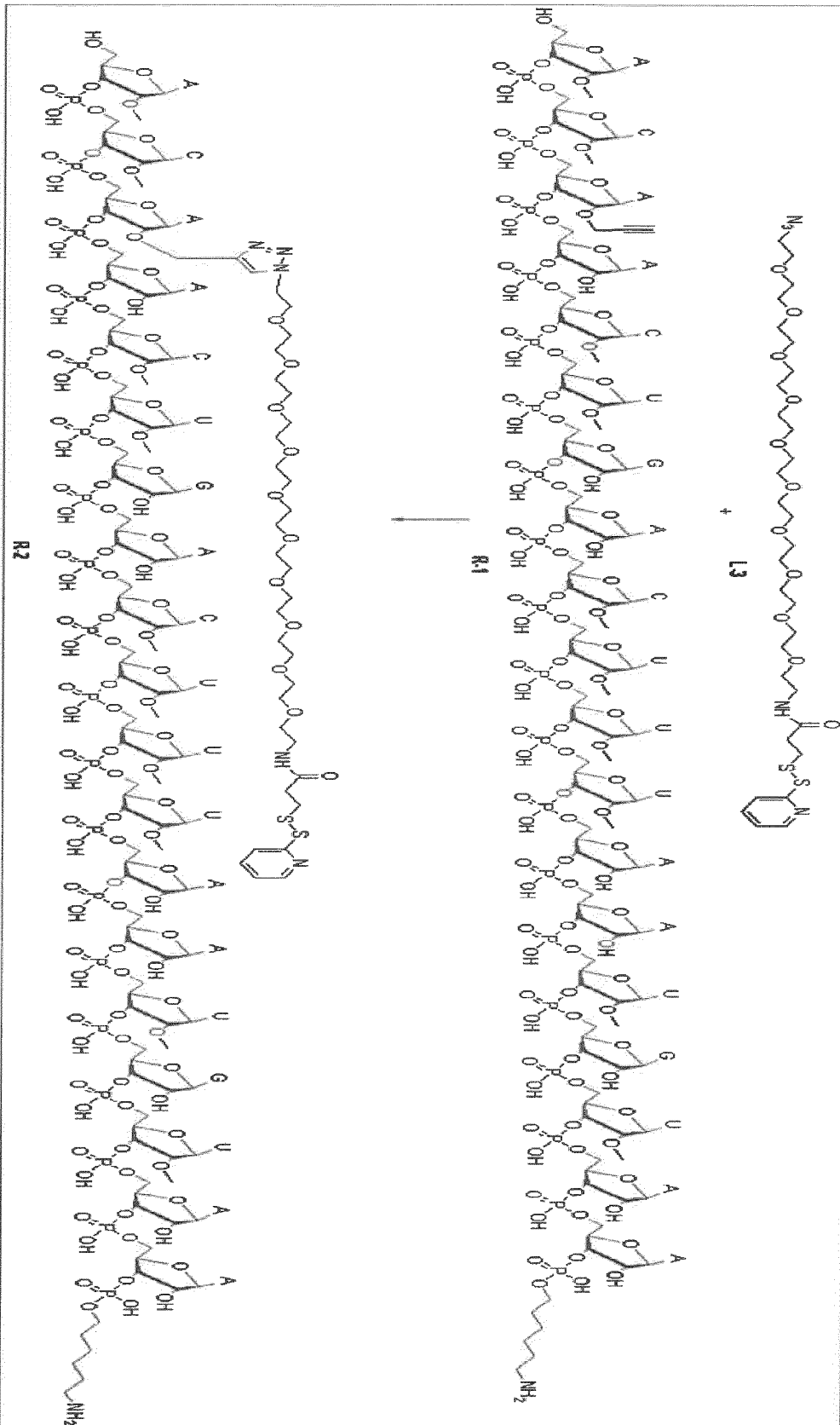
5 A una solución de éster de NHS L-2 (100,0 mg, 0,320 mmol) en 0,5 ml de DCE anhidro se añadió azidoamina L-1 (253,0 mg, 0,480 mmol) en 0,5 ml de DCE anhidro, seguido de la adición de 1,5 eq. de trietilamina. La solución resultante se agitó durante 1 h a temperatura ambiente y la mezcla de reacción se cargó en una columna de sílice, que se eluyó con MeOH/DCM = 0/100 a 10/90 durante 25 min. La fracción recolectada de L-3 se sometió a análisis LC-MS y el resultado indicó que el producto tenía una pureza >95 %.

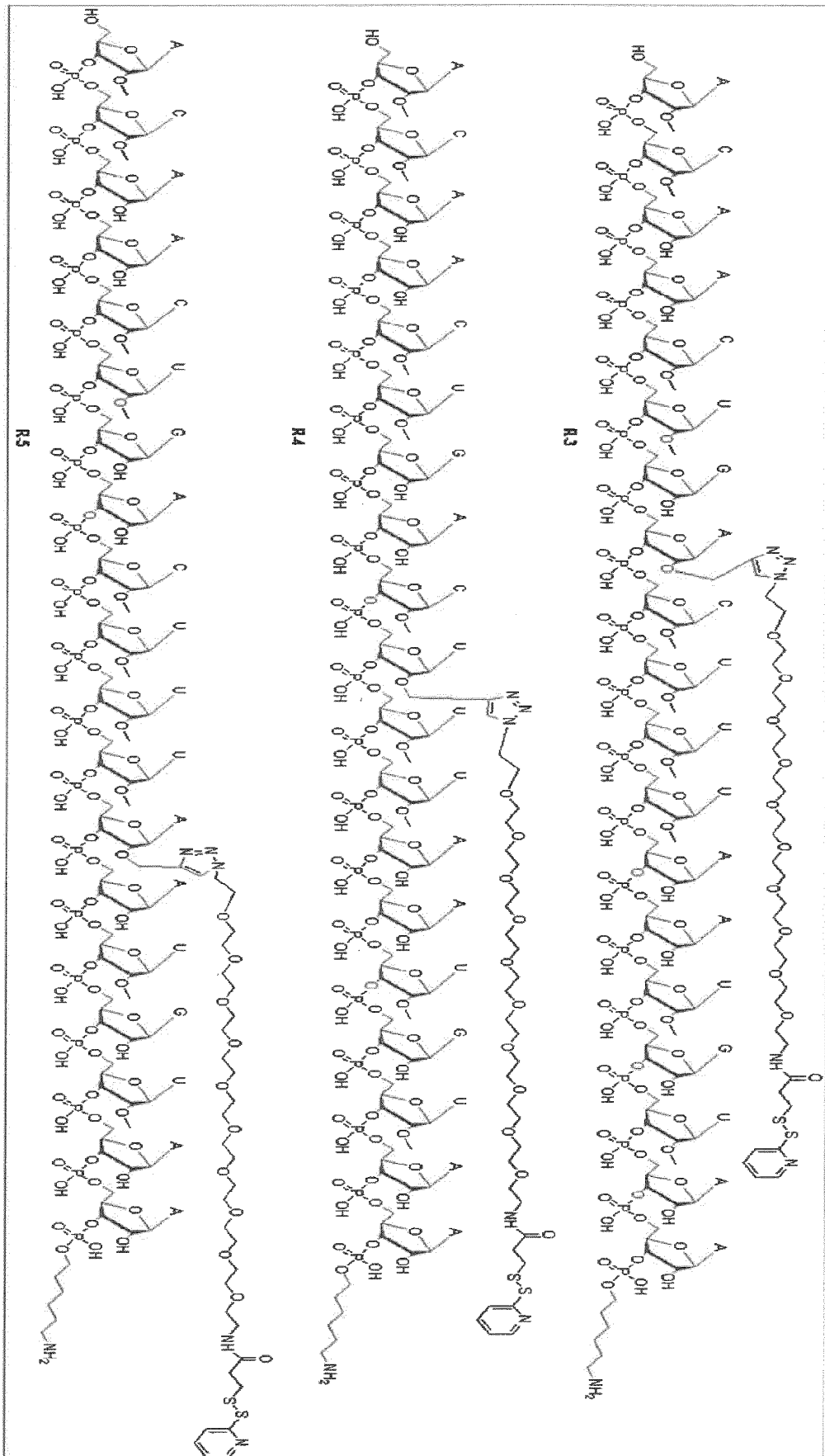
Siguiendo procedimientos análogos, se prepararon azido disulfuros L-4 a L-6 con una pureza por HPLC >95%, L-7 se preparó a partir de éster de SPDP-PEG-NHS polidisperso.

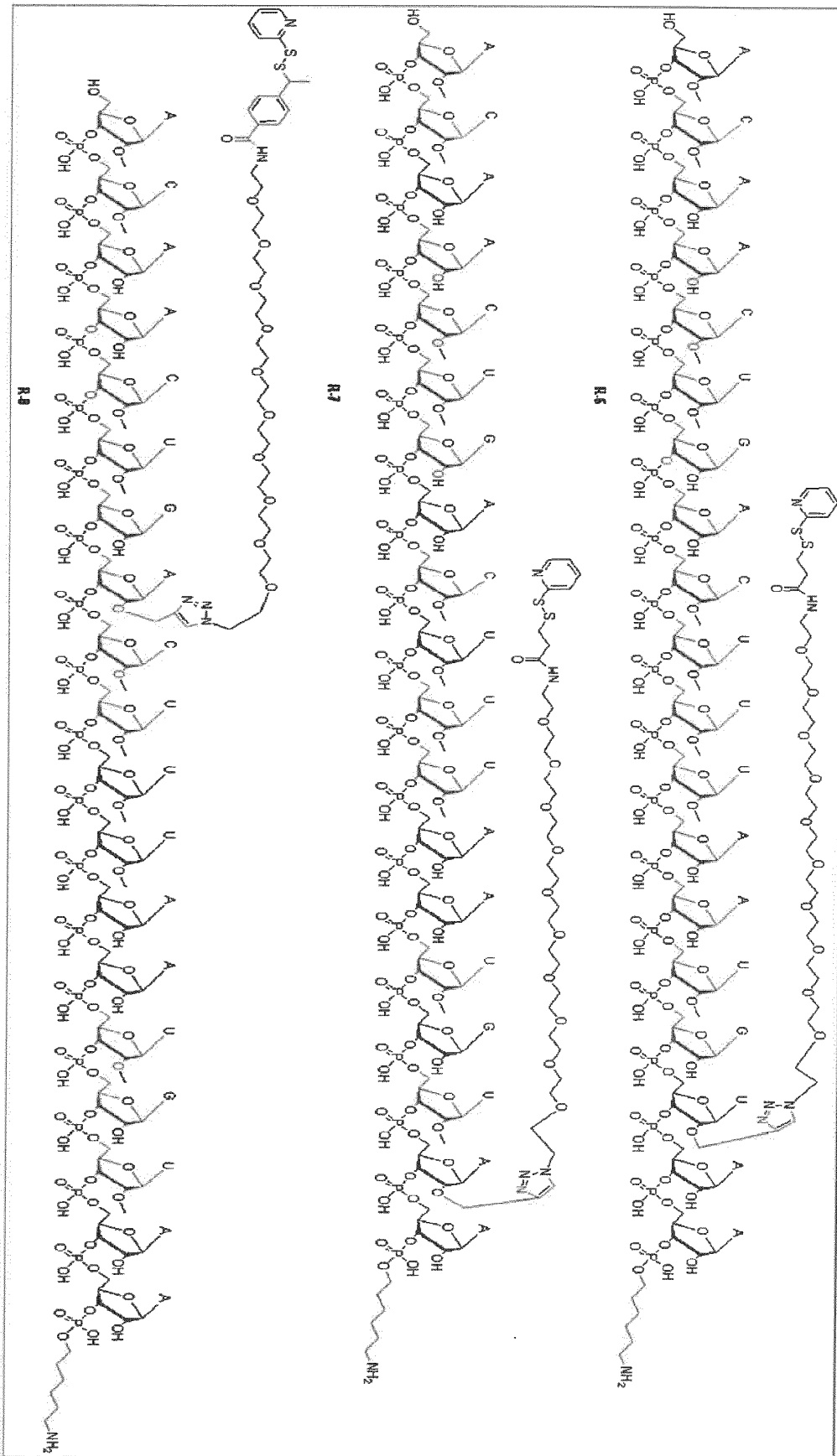
### Ejemplo 2

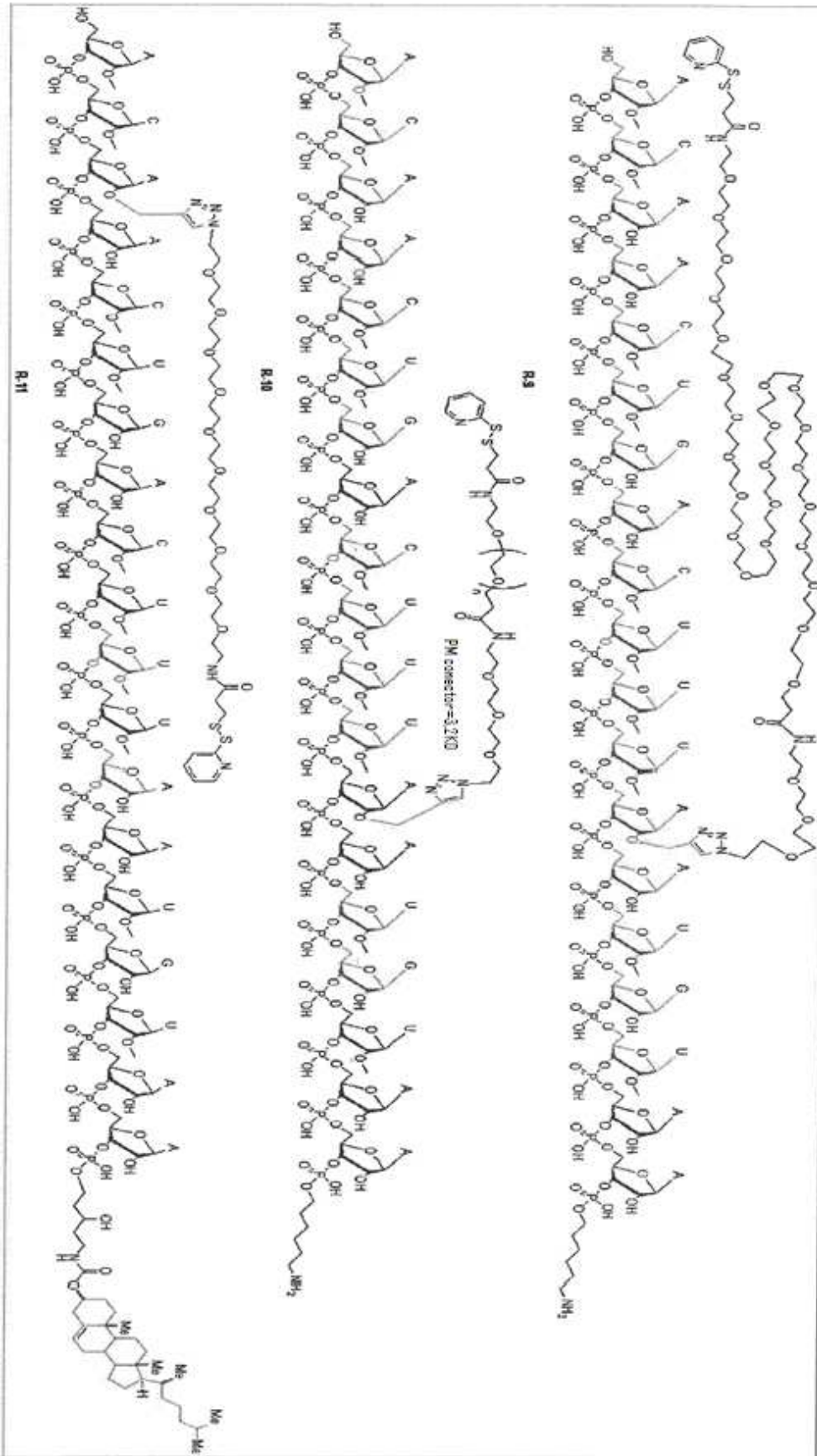
10 El oligonucleótido bruto R-1, 15 mg, se trató con azido-peg9-SPDP L-3 (25,3 mg, 0,035 mmol) y CuBr·Me<sub>2</sub>S (0,760 mg, 3,70 μmol) en 3 mL de DMA/Agua=3/1. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 48 h a temperatura ambiente, seguido de la adición de 2,0 ml de NH<sub>4</sub>F al 40 %/agua =1/1. La mezcla bifásica se agitó a 65 °C durante 1 h, luego se purificó con cartuchos C<sub>18</sub> para dar un sólido blanco bruto R-2 ~ 5 mg.

Siguiendo procedimientos análogos, se prepararon los disulfuros de RNA R-3 - R-11 respectivamente.







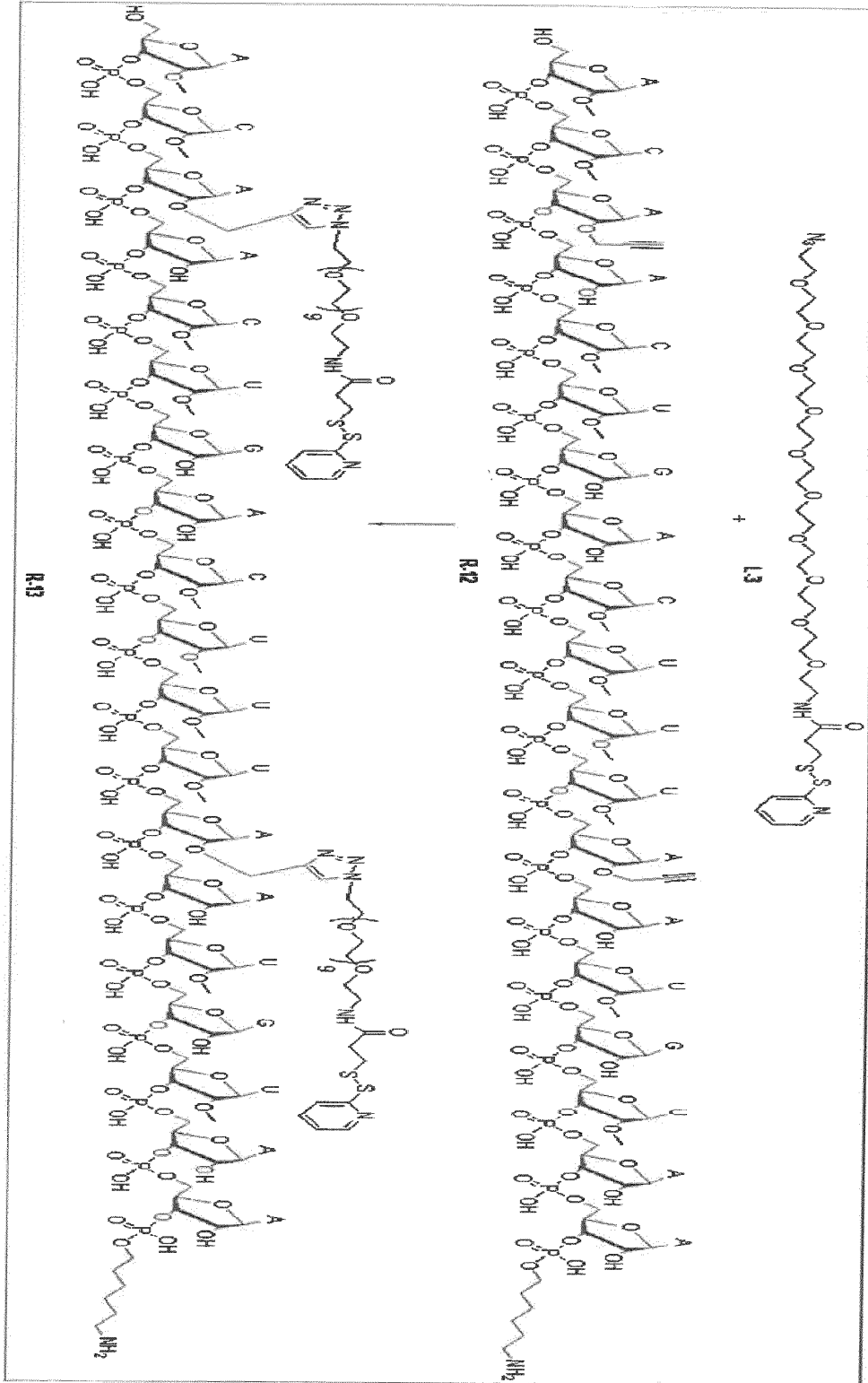


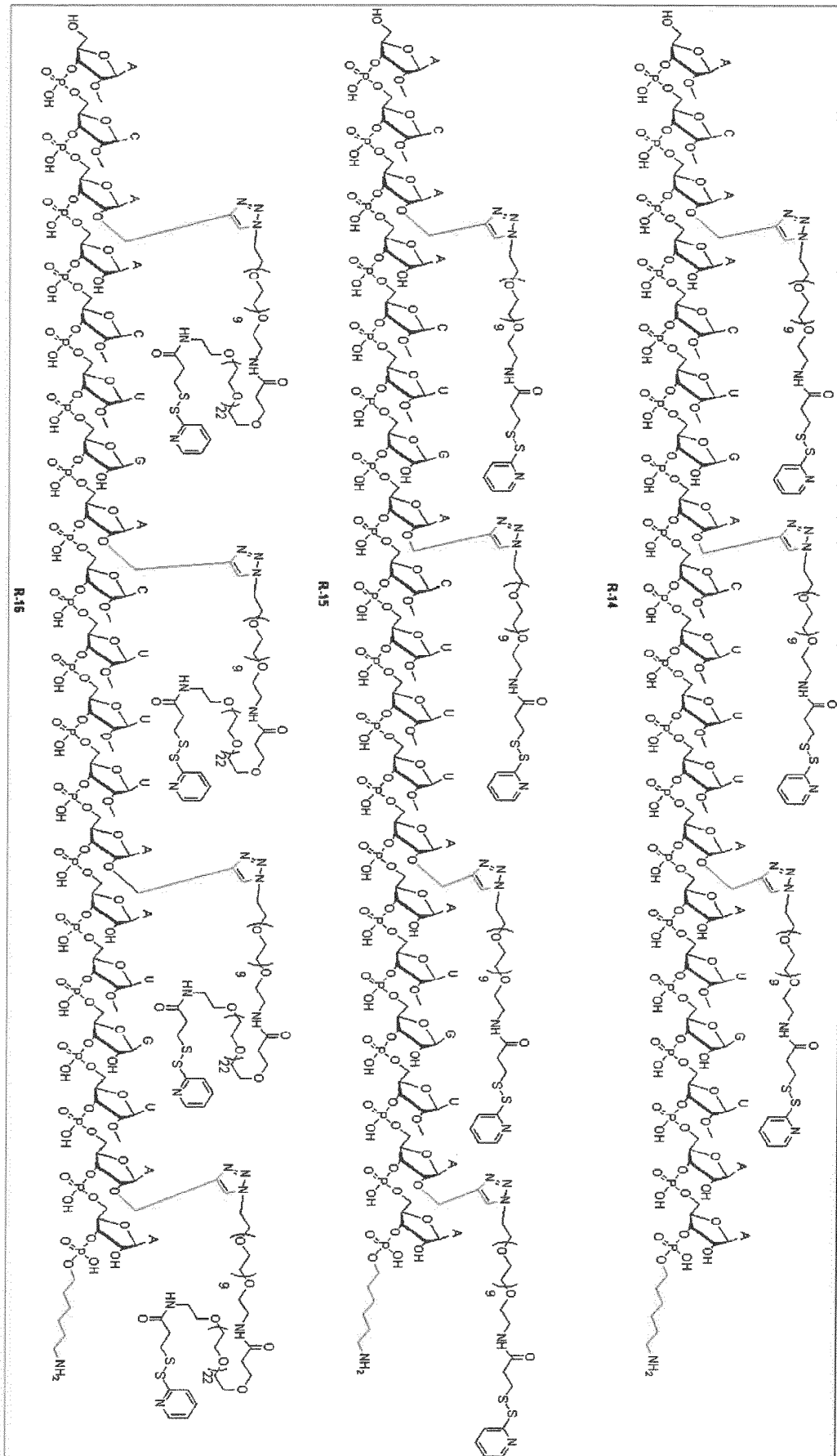
**Ejemplo 3**

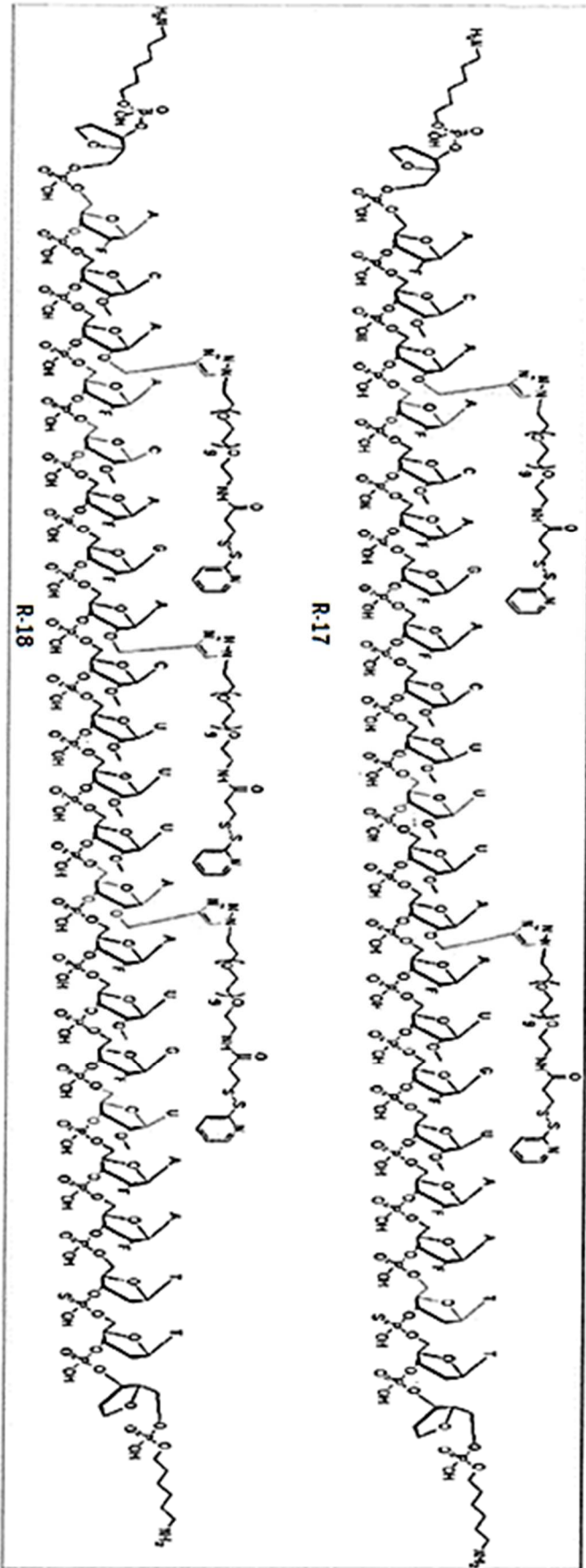
El oligonucleótido bruto R-12, 50 mg, se trató con azido-peg9-SPDP L-3 (40,0 mg, 0,055 mmol) y CuBr·Me<sub>2</sub>S (2,50 mg, 12 μmol) en 4 mL de DMA/Agua=3/1. La mezcla de reacción resultante se agitó durante 48 h a temperatura ambiente, seguido de la adición de 2,0 ml de NH<sub>4</sub>F al 40 %/agua=1/1. La mezcla bifásica se agitó a 65 °C durante 1 h, luego se purificó con cartuchos C18 para dar un sólido blanco bruto R-13 ~ 15 mg.

5

Si siguiendo procedimientos análogos, se prepararon los disulfuros de RNA R-14 - R-18 respectivamente.



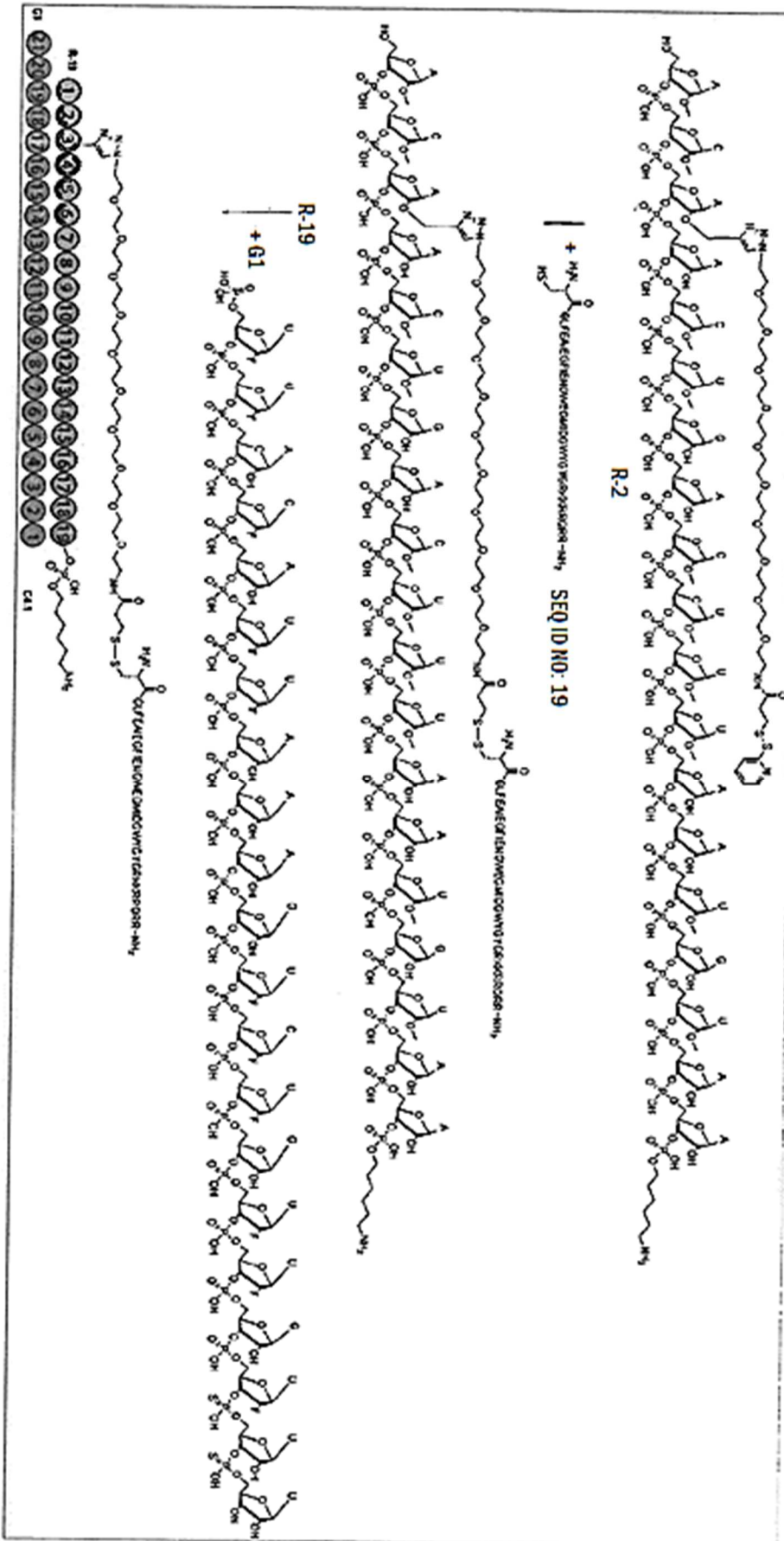


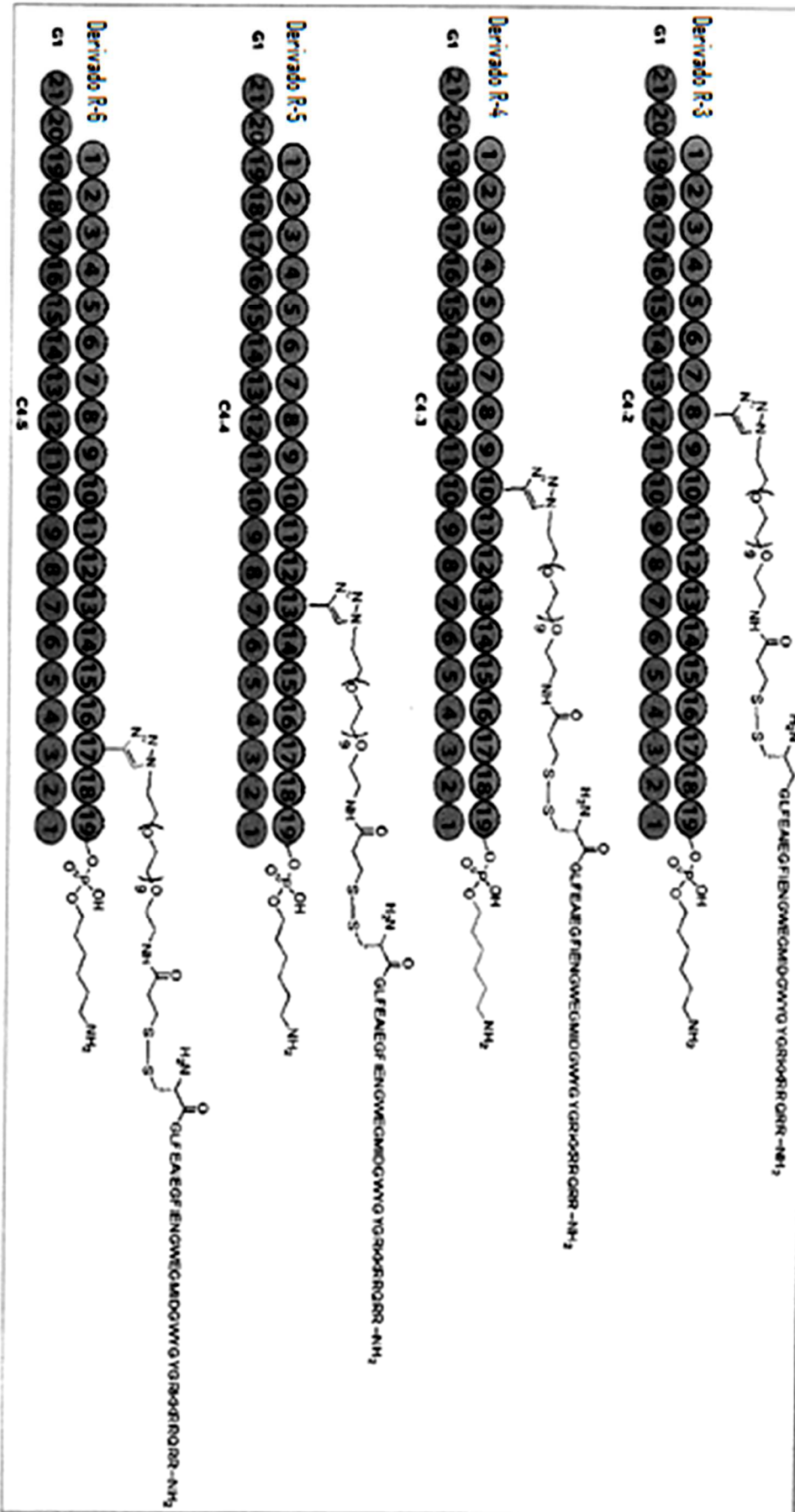


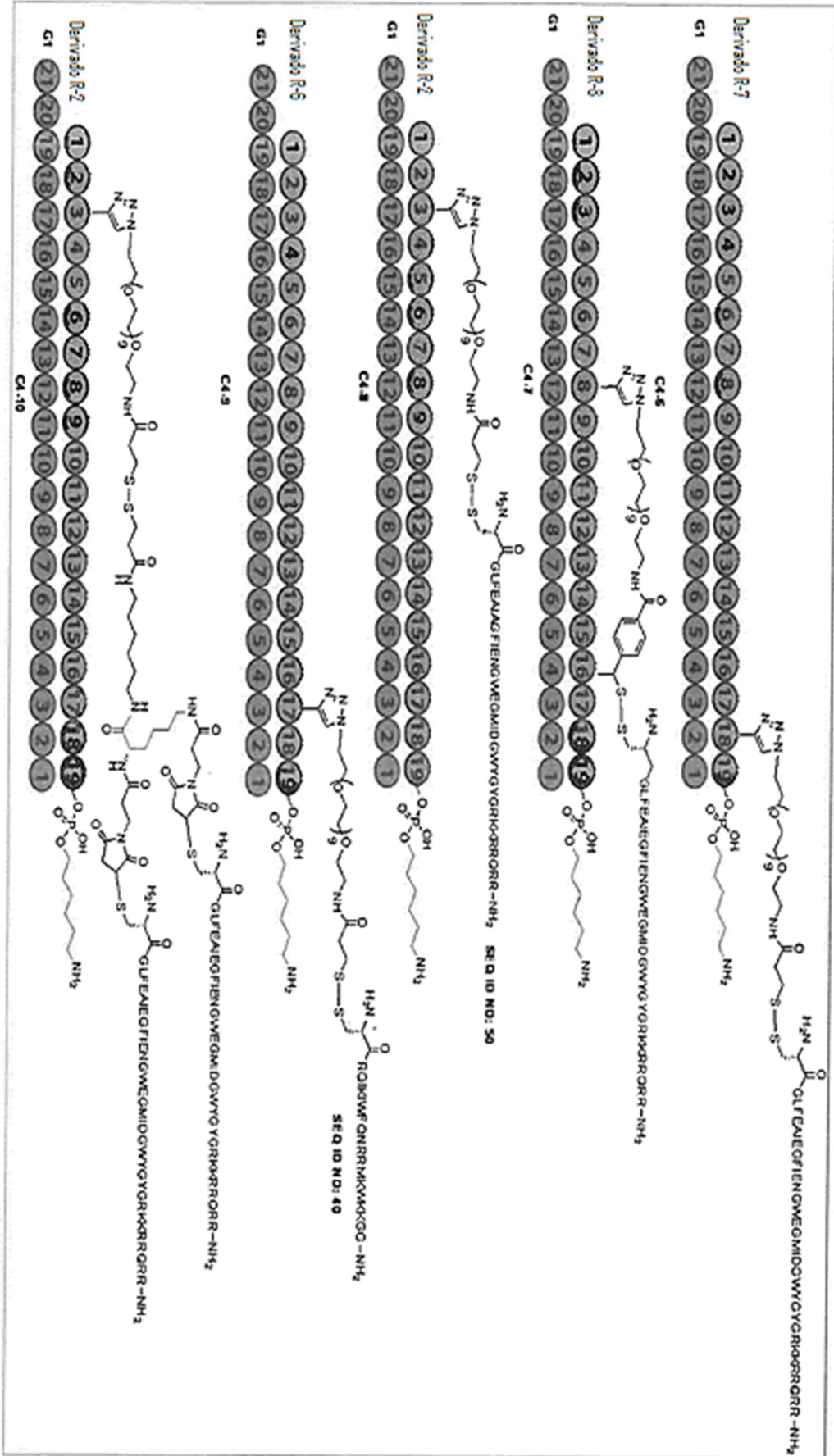
**Ejemplo 4**

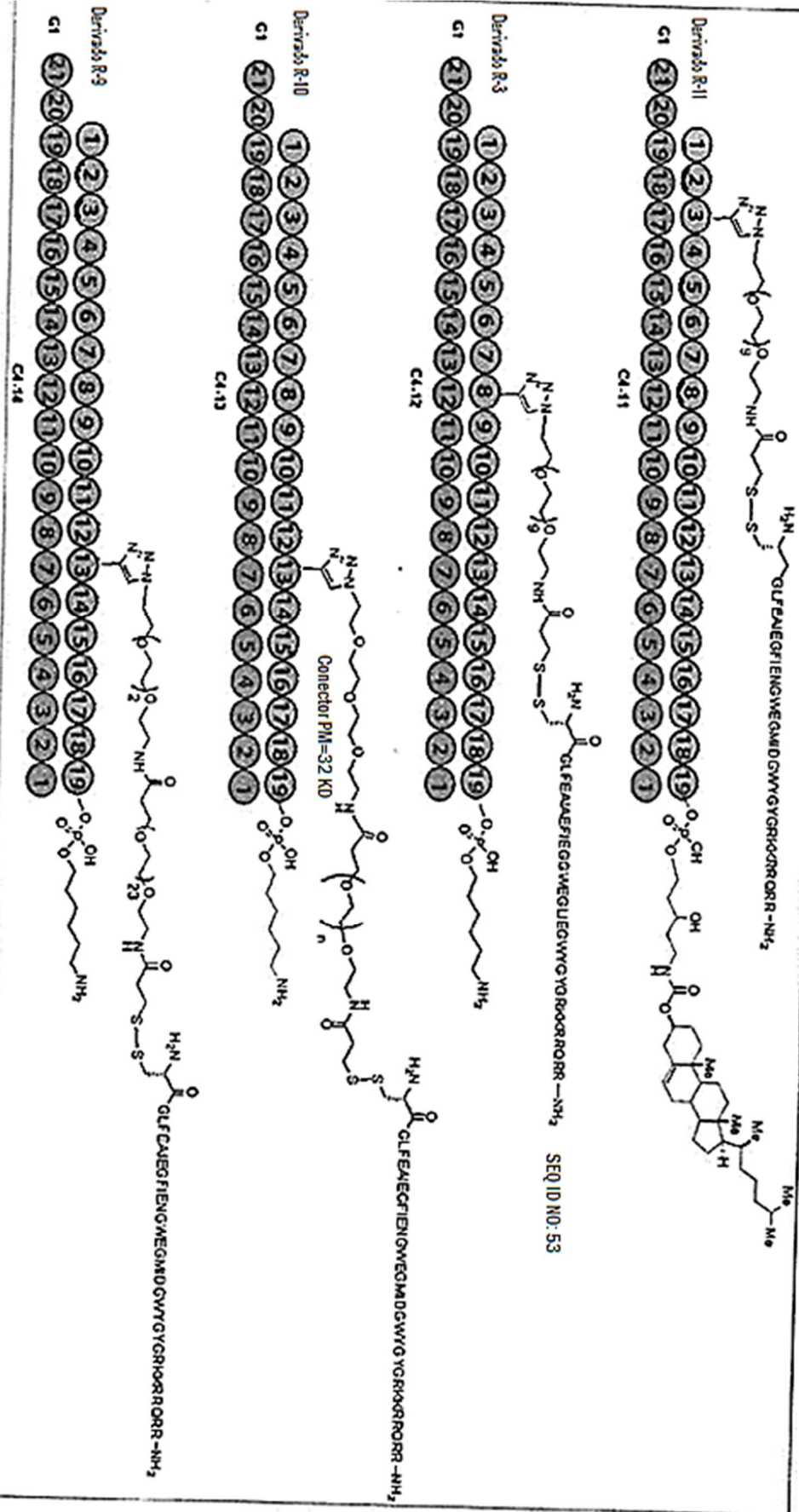
- El compuesto R-2 (1,50 mg, 0,211  $\mu$ mol) en 400  $\mu$ l de formamida/tampón Tris de pH=6,8 =3/1 se trató con el péptido SEQ ID NO: 19 (1,724 mg, 0,423  $\mu$ mol) en 400  $\mu$ l del mismo tampón y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h. La reacción se diluyó mediante la adición de formamida/tampón Tris de pH=6,8=3/1 hasta un volumen total de 2,5 ml y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte en una columna Resource Q (25-75% B en A, A: formamida/H<sub>2</sub>O=1/1, 20 mmol Tris·HCl, pH=7,4, B: formamida/H<sub>2</sub>O=1/1, 20 mmol Tris·HCl, 400 mmol NaClO<sub>4</sub>, pH=7,4). Las fracciones de producto combinadas se diluyeron con agua y se dializaron por centrifugación 4 veces frente a agua con una membrana de corte de peso molecular 10.000. El dialito se liofilizó para proporcionar R-19 como un sólido blanco, masa = 11063.
- 5
- 10 Se mezcló una cantidad equimolar de la hebra guía G1 con el compuesto R-19 para producir el correspondiente dúplex C4-1 bicatenario. La integridad del dúplex se comprobó mediante análisis CE y el conjugado se sometió a evaluaciones biológicas.

Siguiendo procedimientos análogos, se prepararon los conjugados de disulfuro de RNA C4-2 a C4-14 respectivamente y se sometieron a evaluaciones biológicas.









**Ejemplo 5**

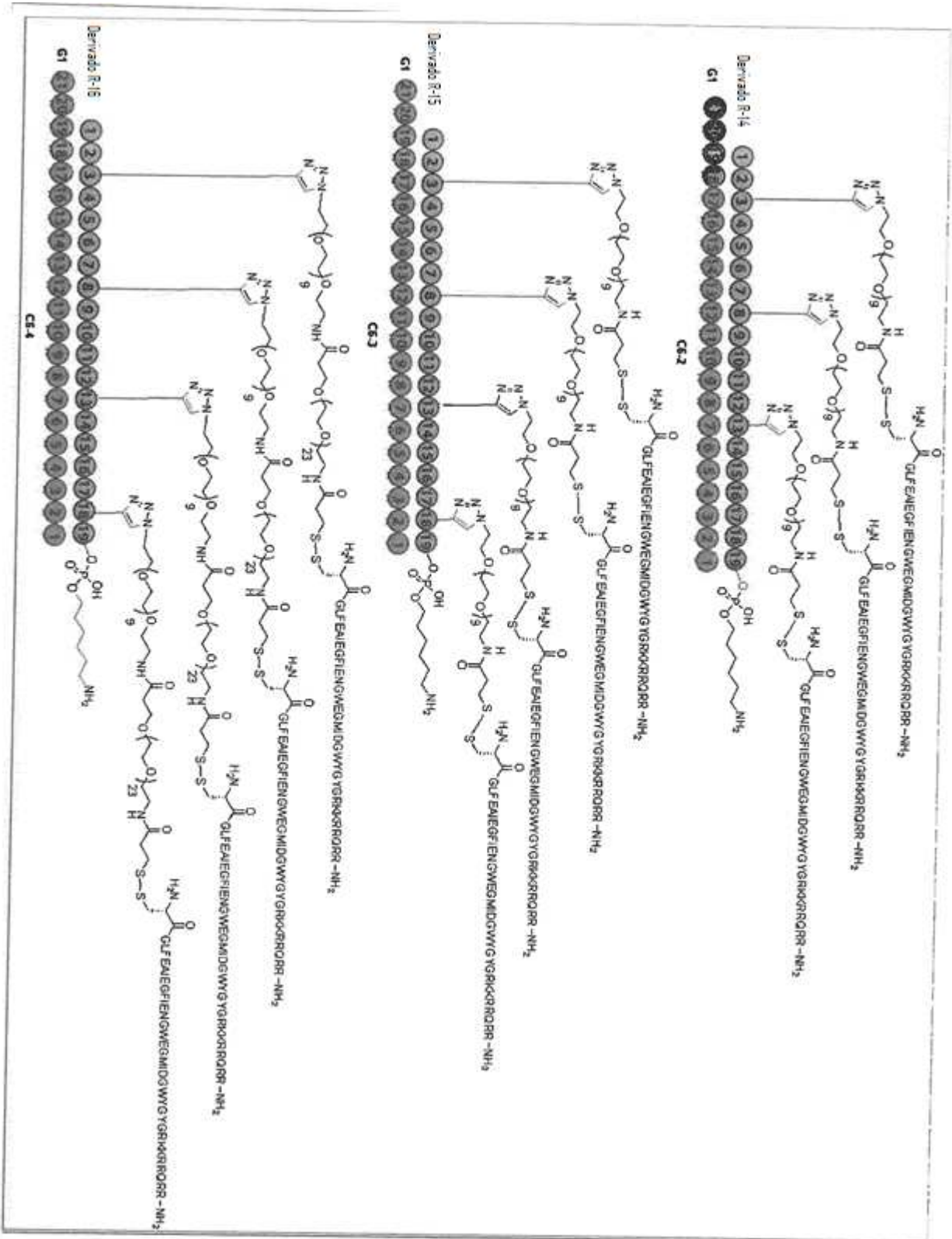
- 5 El péptido SEQ ID NO: 19 (10,0 mg, 2,45  $\mu$ mol) se disolvió en 500  $\mu$ l de tampón TEAA pH=6,5 y se añadió gota a gota al conector L-8 (38,4 mg, 0,074 mmol) en 500  $\mu$ l de tampón TEAA pH=6,5. La reacción se agitó durante 2 h y se purificó mediante RP HPLC 10-90 % MeCN/agua durante 20 min. Las fracciones recogidas se liofilizaron para dar un sólido blanco SEQ ID NO: 19-1 que tenía una pureza >95 % mediante análisis LC-MS.
- El agente reaccionante R-3 (2,00 mg, 0,282  $\mu$ mol) y TCEP (0,808 mg, 2,82  $\mu$ mol) se disolvieron en 0,5 ml de tampón Tris de pH=6,8 y se agitaron durante 2 h. El rastreo de LC-MS indicó la escisión del enlace disulfuro R-3, luego la mezcla de reacción se cargó en una columna de desalinización PD-10. Las fracciones recolectadas se liofilizaron para dar un sólido blanco R-20 y se usaron para la siguiente reacción sin purificación adicional.
- 10 El compuesto R-20 (2,00 mg, 0,286  $\mu$ mol) en 300  $\mu$ l de formamida/tampón Tris de pH=6,8 = 3/1 se trató con el péptido SEQ ID NO: 19-1 (3,95 mg, 0,859  $\mu$ mol) en 300  $\mu$ l del mismo tampón y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 h. La reacción se diluyó mediante la adición de formamida/tampón Tris de pH=6,8 = 3/1 hasta un volumen total de 2,5 ml y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte en una columna Resource Q (25-75 % B en A, A: formamida/H<sub>2</sub>O=1/1, 20 mmol Tris·HCl, pH=7,4, B: formamida/H<sub>2</sub>O=1/1, 20 mmol Tris·HCl, 400 mmol NaClO<sub>4</sub>, pH=7,4). Las fracciones de producto combinadas se diluyeron con agua y se dializaron por centrifugación 4 veces frente a agua con una membrana de corte de peso molecular 10.000. El dialito se liofilizó para proporcionar R-21 (0,71 mg, 21,4%, >95 % de pureza) como un sólido blanco.
- 15
- 20 Se mezcló una cantidad equimolar de la hebra guía G1 con el compuesto R-21 para producir el correspondiente dúplex C5-1 bicatenario. La integridad del dúplex se comprobó mediante análisis CE y el conjugado se sometió a evaluaciones biológicas.

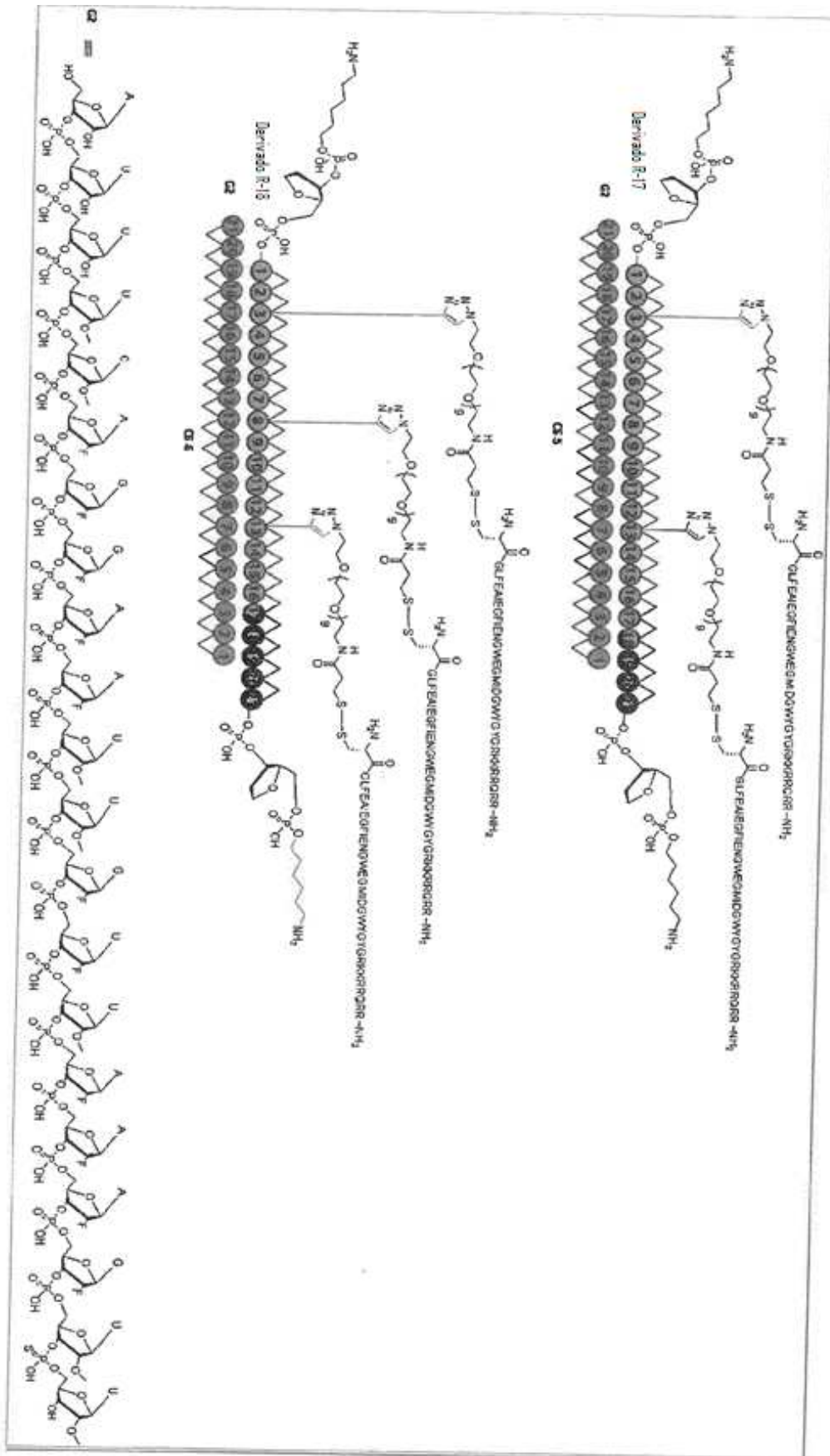


Se mezcló una cantidad equimolar de la hebra guía G1 con el compuesto R-22 para producir el correspondiente dúplex C6-1 bicatenario. La integridad del dúplex se comprobó mediante análisis CE y el conjugado se envió para evaluaciones biológicas.

5 Siguiendo procedimientos análogos, se prepararon conjugados de disulfuro de RNA C6-2 a C6-6 y se sometieron a evaluaciones biológicas.







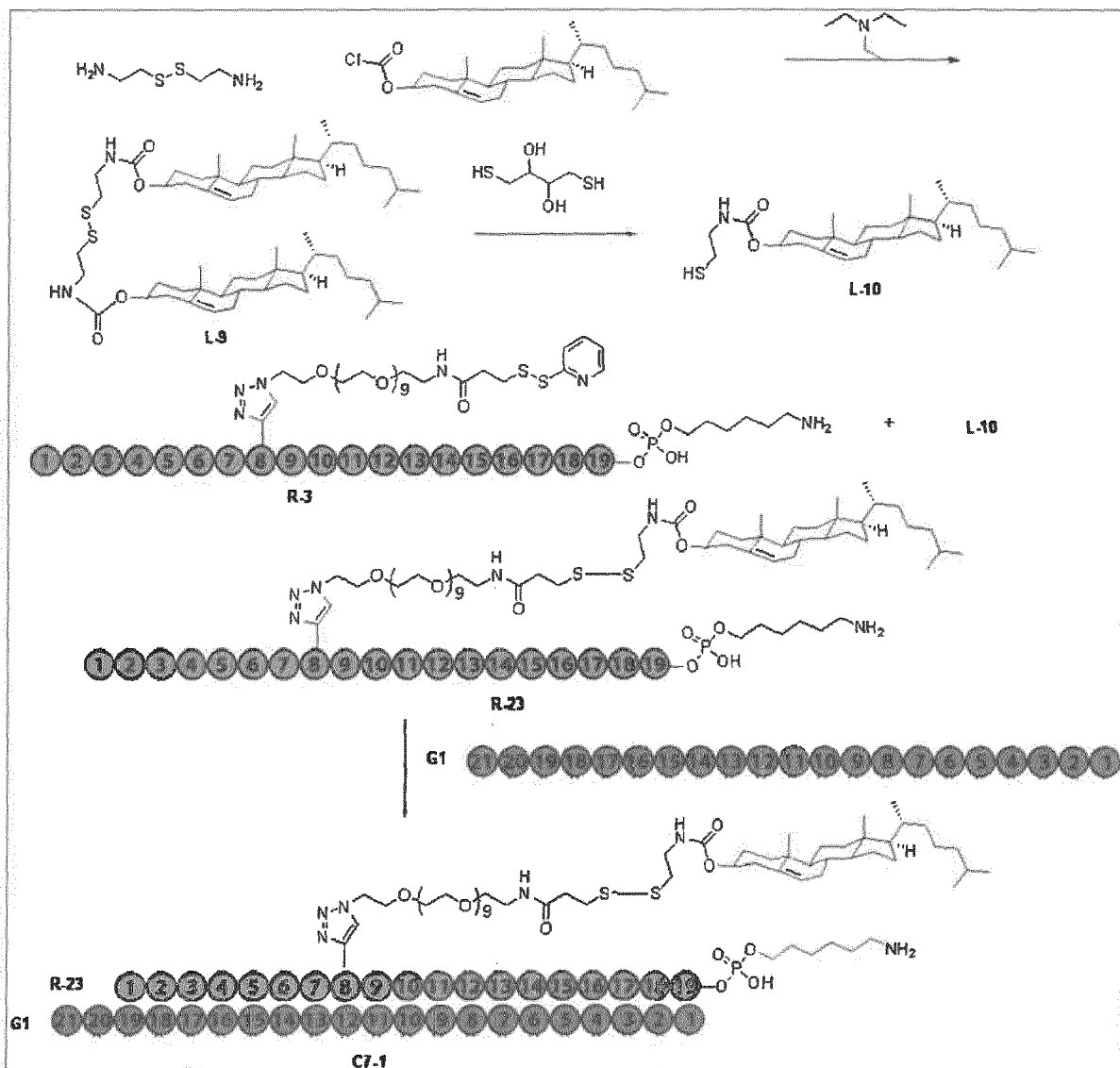
Ejemplo 7

Se disolvieron cistamina (1,13 g, 5,02 mmol) y cloroformato de colesterol (4,96 g, 11,04 mmol) en 20 ml de DCM, seguido de la adición de TEA (3,50 ml, 25,09 mmol) a 0 °C. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 h. Se separó el disolvente y el residuo se purificó mediante columna de sílice (EtOAc/hexanos = 0/100 a 50/50 durante 25 min) para proporcionar L-9 como un sólido blanco (2,44 g, 50%).

L-9 (440 mg, 0,450 mmol) y DTT (174 mg, 1,125 mmol) se disolvieron en THF/agua = 20/1 y se agitaron durante la noche. Se eliminó el disolvente y el residuo se purificó mediante columna de sílice para proporcionar tiol L-10 (300 mg, 68%) como un sólido blanco.

R-3 (3,00 mg, 0,423 μmol) y L-10 (2,071 mg, 4,23 μmol) se disolvieron en THF/tampón Tris pH=6,8 = 10/1 600 μL y se agitó durante 3 h. La mezcla de reacción se purificó por C<sub>4</sub> RP HPLC con TEAA como aditivo. Las fracciones recogidas se dializaron 3 veces frente a una membrana 3k y se liofilizaron para dar un sólido blanco R-23 (0,61 mg, 19 %, >95 % de pureza).

Se mezcló una cantidad equimolar de la hebra guía G1 con el compuesto R-23 para producir el correspondiente dúplex C7-1 bicatenario. La integridad del dúplex se comprobó mediante análisis CE y el conjugado se envió para evaluaciones biológicas.



Ejemplo 8

Una solución de R-2 (5,00 mg, 0,705 μmol) en 0,3 ml de tampón Tris de pH=8 se enfrió a 0 °C y se trató con una solución de L-11 (2,76 mg, 4,93 μmol) en 0,3 ml de MeCN. La solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 0,5 h. La reacción bruta se diluyó con 18 ml de agua y se dializó por centrifugación cuatro veces contra agua

## ES 2 908 978 T3

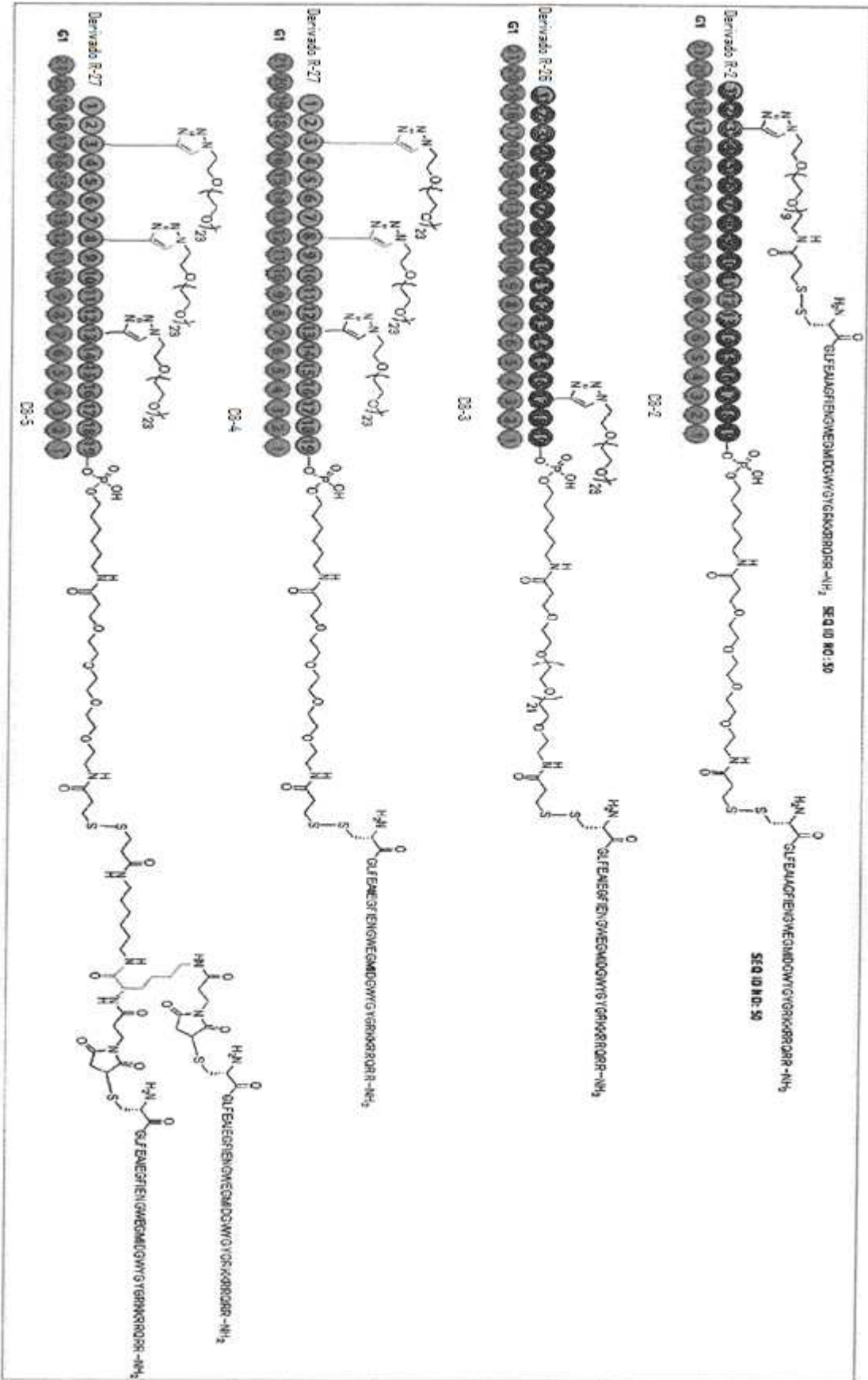
usando una membrana de diálisis MW 3K. El dialito se liofilizó para proporcionar el producto deseado R-24 como un polvo amorfo blanco esponjoso, masa medida = 7540.

5 Una solución de R-24 (1,0 mg, 0,133  $\mu$ mol) en 400  $\mu$ L de formamida/tampón Tris de pH=6,8 = 3/1 se trató con una solución de SEQ ID NO: 19 (2,164 mg, 0,530  $\mu$ mol) en 400  $\mu$ L de formamida/tampón Tris de pH=6,8 = 3/1 y la solución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1,0 h. La reacción bruta se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico preparatoria en un aparato Gilson utilizando una columna ResourceQ de 6 ml y un gradiente lineal de A sobre B al 25-70 % (A = Tris·HCl 20 mM, formamida al 50 %, pH = 7,4; B = Tris·HCl 20 mM, NaClO<sub>4</sub> 400 mM, formamida al 50%, pH=7,4). El pico del producto se diluyó con agua y se dializó por centrifugación cuatro veces frente a agua usando una membrana de diálisis de PM 10K. El dialito se liofilizó para proporcionar 0,32 mg del conjugado R-25 deseado como un polvo amorfo blanco esponjoso.

10 Se mezcló una cantidad equimolar de la hebra guía G1 con el compuesto R-25 para producir el correspondiente dúplex bicatenario C8-1 . La integridad del dúplex se comprobó mediante análisis CE y el conjugado se sometió a evaluaciones biológicas.

15 Siguiendo procedimientos análogos, se prepararon los conjugados de disulfuro de RNA C8-2 a C8-6 y se sometieron a evaluaciones biológicas.

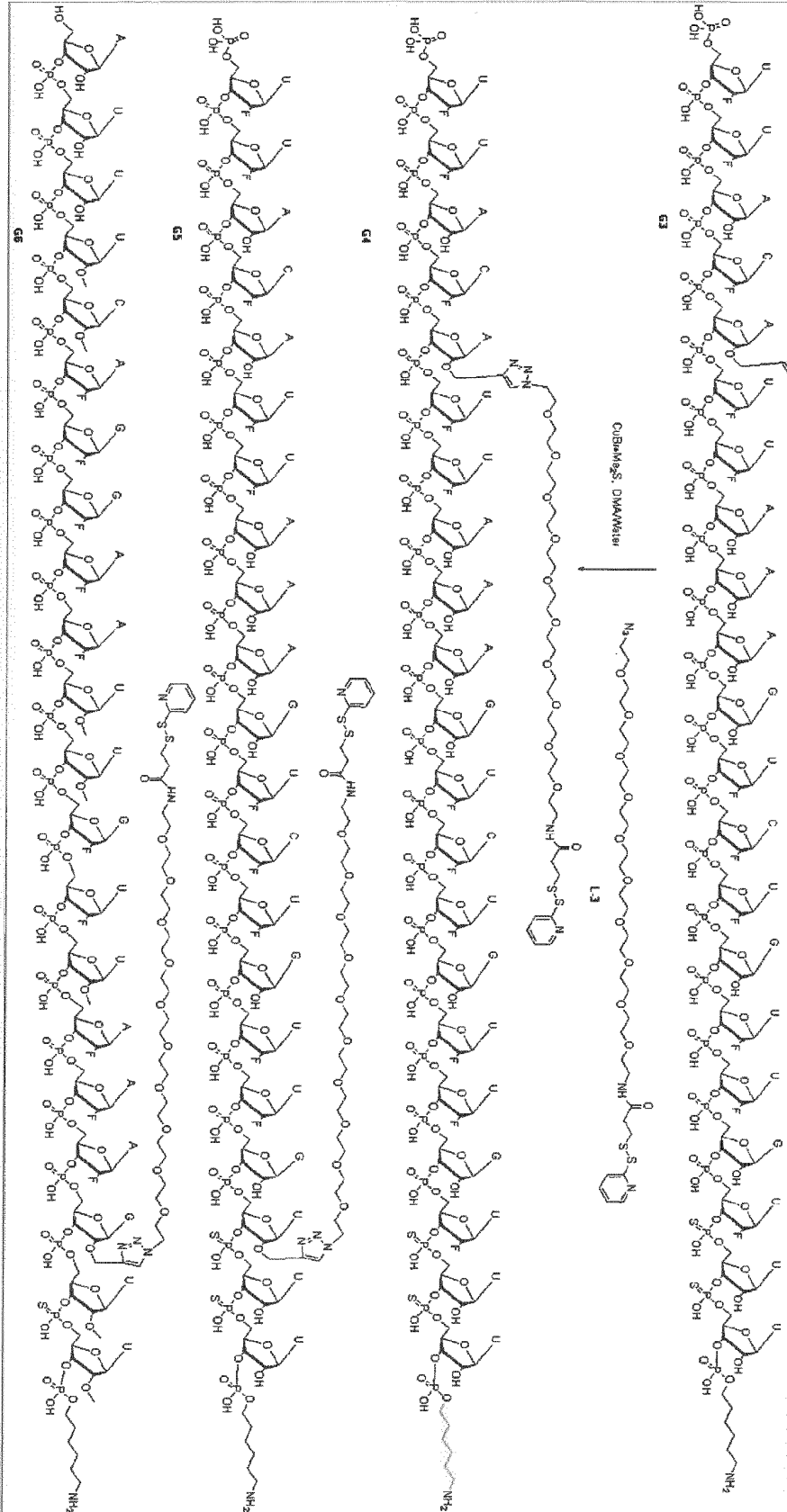






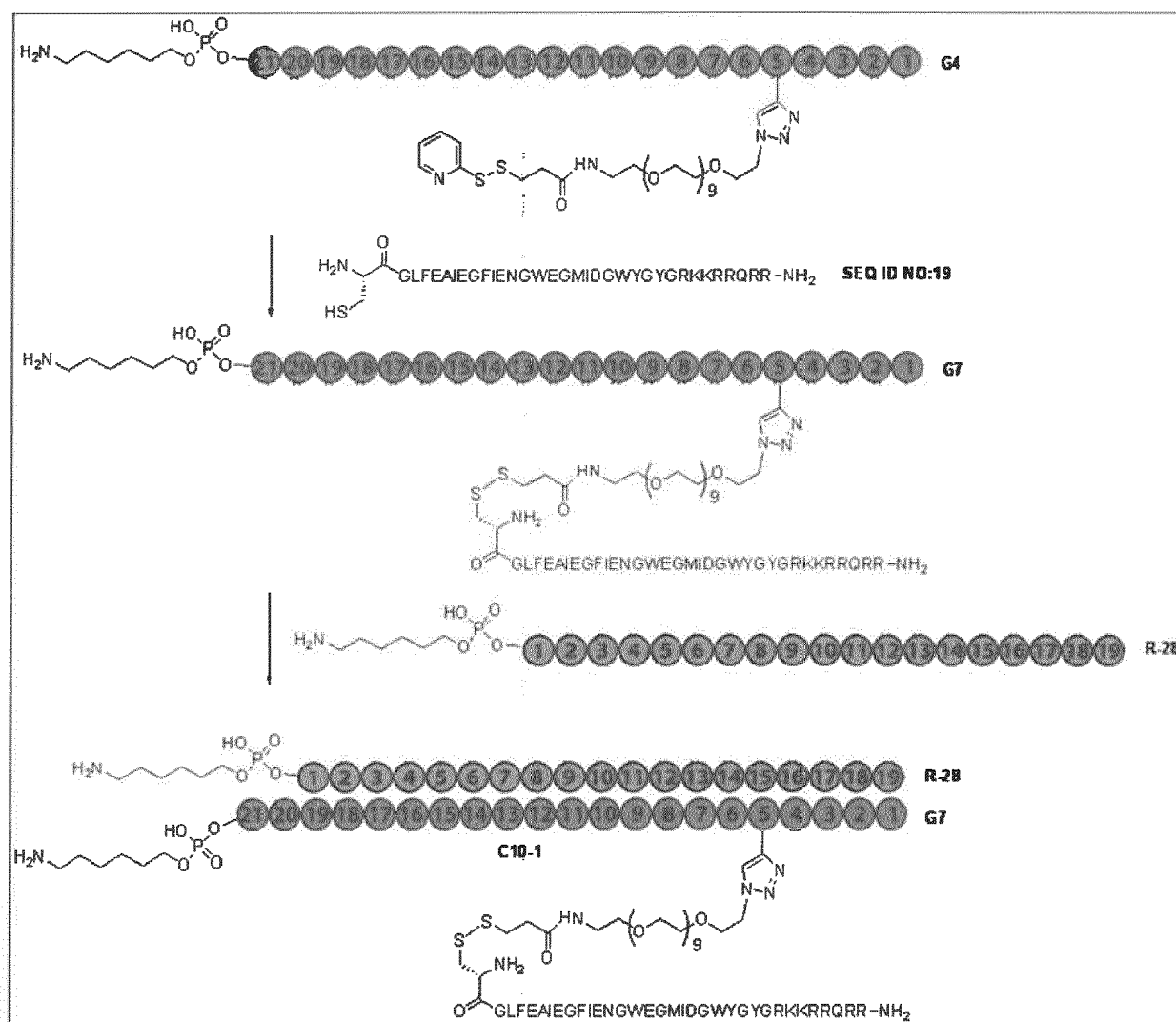
ambiente, seguido de la adición de 2,0 ml de NH<sub>4</sub>F al 40 %/agua=1/1. La mezcla bifásica se agitó a 65 °C durante 1 h, luego se purificó utilizando cartuchos C<sub>18</sub> para dar un sólido blanco bruto G4.

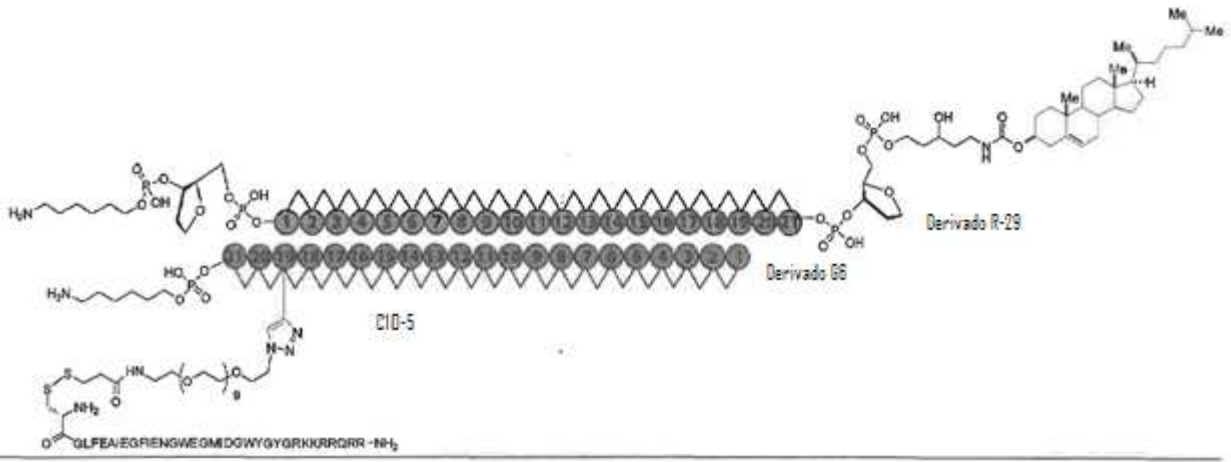
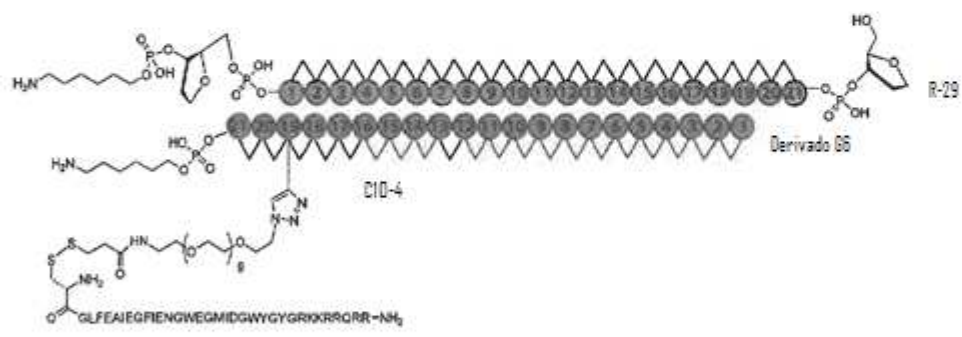
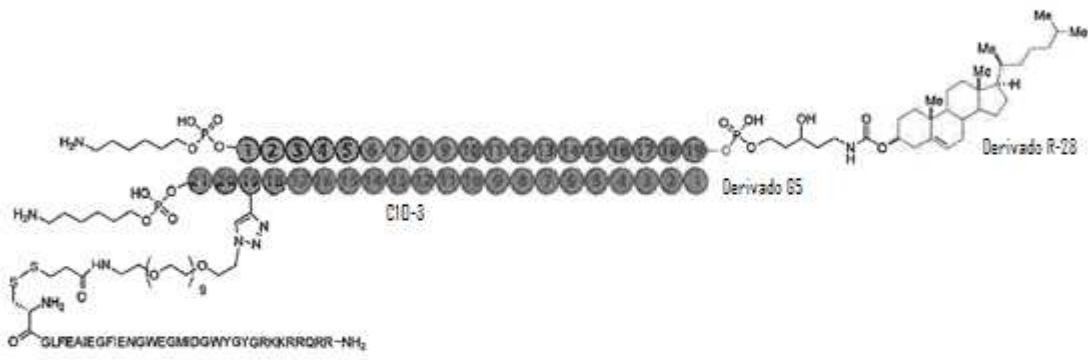
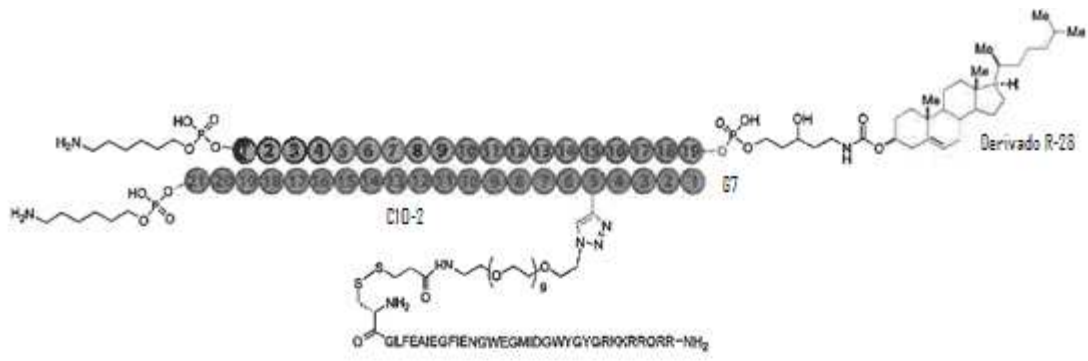
Si siguiendo procedimientos análogos, se prepararon los disulfuros de RNA G5 y G6 respectivamente.

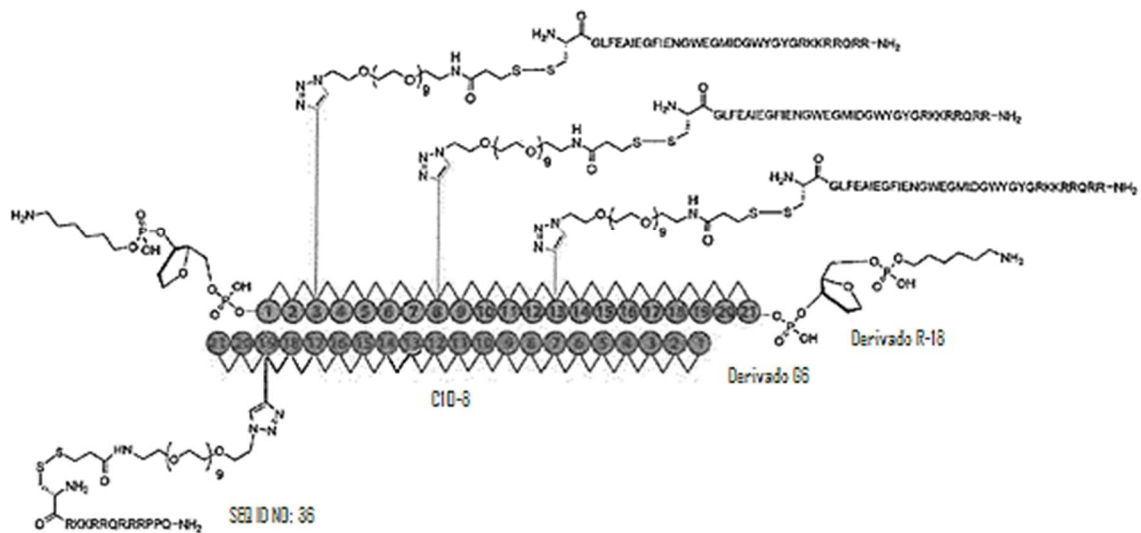
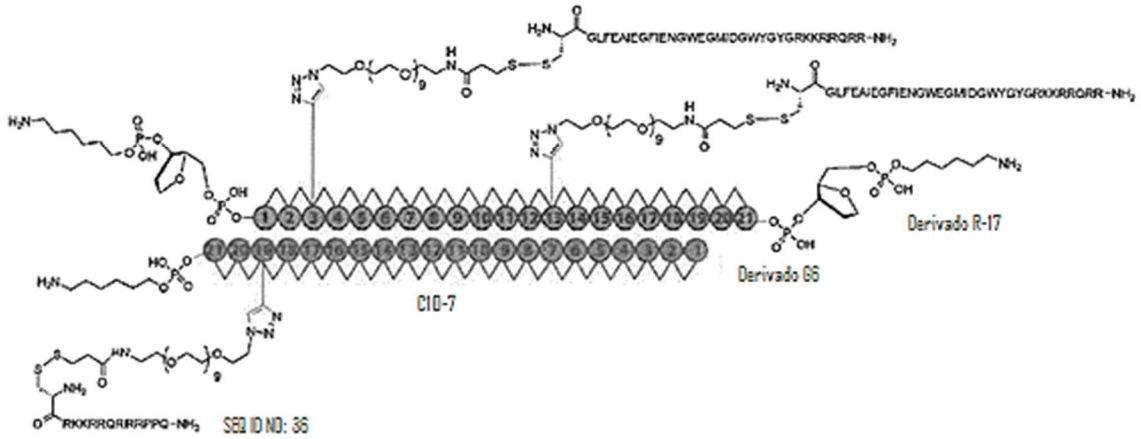
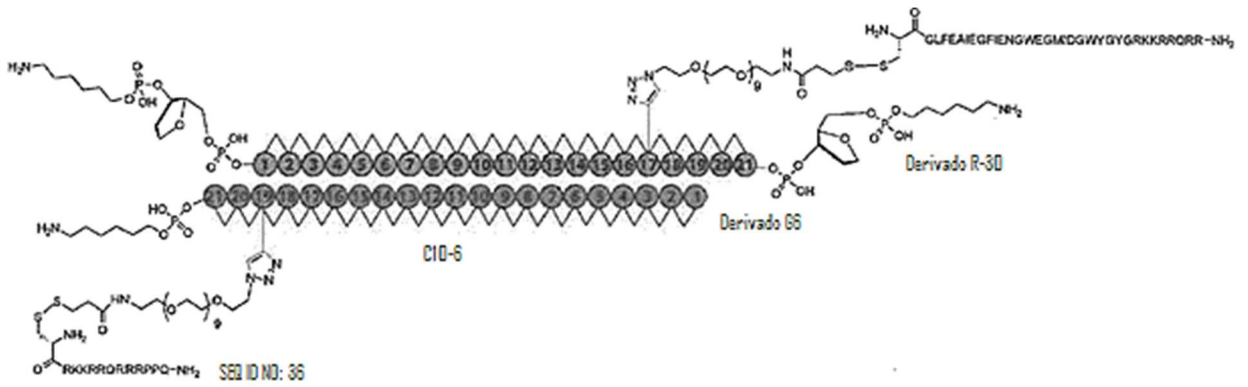


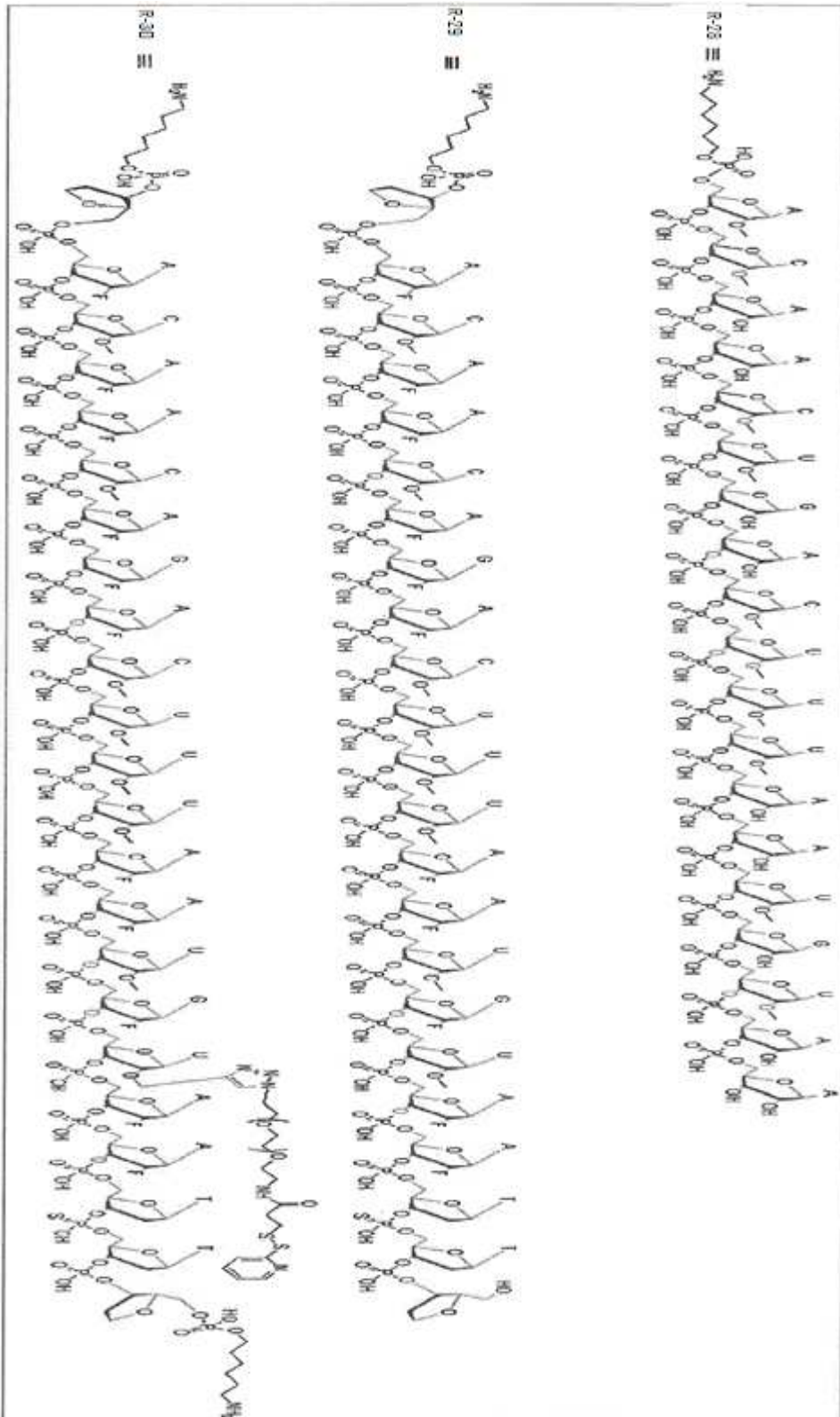
**Ejemplo 10**

- El compuesto G4 (3,00 mg, 0,391  $\mu$ mol) en 300  $\mu$ l de formamida/tampón Tris de pH=6,8 = 3/1 se trató con el péptido SEQ ID NO: 19 (3,19 mg, 0,782  $\mu$ mol) en 300  $\mu$ l del mismo tampón y la mezcla de reacción resultante se agitó durante 0,5 h. La reacción se diluyó mediante la adición de formamida/tampón Tris de pH=6,8 = 3/1 hasta un volumen total de 2,5 ml y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico fuerte en una columna Resource Q (25-75 % B en A, A: formamida/ H<sub>2</sub>O=1/1, 20 mmol Tris·HCl, pH=7,4, B: formamida/H<sub>2</sub>O=1/1, 20 mmol Tris·HCl, 400 mmol NaClO<sub>4</sub>, pH=7,4). Las fracciones de producto combinadas se diluyeron con agua y se dializaron por centrifugación 4 veces frente a agua con una membrana de corte de peso molecular de 10.000. El dialito se liofilizó para proporcionar 3,5 mg de G7 como un sólido blanco, masa = 11640.
- 5 Se mezcló una cantidad equimolar de la hebra guía G7 con la hebra retardada R-28 para producir el correspondiente dúplex C10-1 de doble hebra. La integridad del dúplex se comprobó mediante análisis CE y el conjugado se sometió a evaluaciones biológicas.
- 10 Siguiendo procedimientos análogos, se prepararon los conjugados de disulfuro de RNA C10-2 a C10-8 respectivamente y se sometieron a evaluaciones biológicas.









**Ensayos**

Protocolo general de ensayo de siRNA

5 Los siRNA descritos en el presente documento se diseñaron para dirigirse al gen SSB expresado de forma ubicua (antígeno B del síndrome de Sjogren; NM\_009278.4). La secuencia del siRNA utilizada es homóloga en transcritos humanos, de ratón y de rata. Para probar la actividad silenciadora de los conjugados de siRNA, se sembraron células

5 HeLa (línea celular de cáncer de cuello uterino humano) en medio (DMEM) complementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS) y se dejaron en cultivo durante la noche (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>). Al día siguiente, se reemplazó el medio con medio sin suero que contenía los conjugados de siRNA en concentraciones que oscilaban entre 10 y 0,0015 μM y se dejó en las células durante un total de 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Los niveles de mRNA de SSB se analizaron usando un ensayo de DNA ramificado según las instrucciones del proveedor (Panomics Quantigene 1.0 bDNA Kit # QG0002) o ensayo Luc. La viabilidad celular se evaluó utilizando el ensayo MTS (Promega cat# TB245) y todos los datos se normalizaron a niveles de células no tratadas.

Las células HeLa se trataron con los compuestos indicados durante 72 horas de forma dependiente de la dosis y los niveles de mRNA de SSB se analizaron mediante ensayo de b-DNA o Luc.

10 En la Fig. 1, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C4-1 durante 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

En la Fig. 2, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C4-5 durante 72 horas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>).

15 En la Fig. 3, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C4-8 durante 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

En la Fig. 4, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C4-10 durante 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

En la Fig. 5, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C6-1 durante 72 horas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>).

20 En la Fig. 6, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C6-2 durante 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

En la Fig. 7, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C7-1 durante 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

25 En la Fig. 8, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C8-1 durante 72 horas (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>).

En la Fig. 9, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C10-7 durante 72 horas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>).

En la Fig. 10, se muestran los niveles de mRNA de SSB después de tratar las células HeLa con el compuesto C10-8 durante 72 horas (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>).

30 Protocolo general de ensayo de siRNA *in vivo*

Todos los procedimientos que involucraron animales se realizaron de acuerdo con la Declaración ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión y fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC) de Merck Research Laboratories, West Point, PA. Se adquirieron ratas macho Brown Norway (6-8 semanas) de Charles River Laboratories. Los siRNA se prepararon asépticamente para minimizar el riesgo de infección. Para la dosificación intravítrea, las ratas se anestesiaron con ketamina/xilazina (40-90/5-10 mg/kg, IM) y se aplicó hidrocloreuro de proparacaína al 1% (1-2 gotas) en el ojo como anestésico tópico. Para la inyección intravítrea, se usó un par de fórceps limpios para proctosar suavemente y mantener el ojo en su lugar, y se usó una jeringa de aguja afilada de 30G para inyectar 5 μl de RNAi de prueba o vehículo de control en el vítreo justo detrás del limbo. El día del sacrificio, las ratas se sacrificaron con pentobarbital sódico (150-200 mg/kg, IP). Después de la enucleación, se disecaron y congelaron el vítreo, la retina y el RPE/coroides.

Se realizaron exámenes oculares justo antes de la inyección intravítrea y justo antes de la recolección.

En la Figura 11A, se muestran los niveles de mRNA de SSB en retina de rata para los conjugados C4-1, C4-2, C4-3, C4-4.

En la Figura 11B, se muestran los niveles de mRNA de SSB en la retina de rata para los conjugados C6-5.

45 En la Figura 11C, se muestran los niveles de mRNA de SSB en la retina de rata para los conjugados C10-2 a 2 dosis diferentes.

#### Lista de secuencias

<110> Sirna Therapeutics, Inc.

<120> NUEVAS ENTIDADES QUÍMICAS SIMPLES Y MÉTODOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE OLIGONUCLEOTIDOS

<130> A 8720EU-kl

<150> US 61/378,609

<151> 31/08/2010

160> 59

5 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 1

```
His Phe His His Phe Phe His His Phe Phe His Phe Phe His His Phe
 1           5           10           15
Phe His His Phe
                20
```

<210> 2

15 <211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

20 <400> 2

```
Trp His His Trp Trp His Trp Trp His His Trp Trp His His Trp
 1           5           10           15
```

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 3

```
His Trp His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu
 1           5           10           15
Leu His His Leu
                20
```

30 <210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 4

```
His Leu His His Trp Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu
 1           5           10           15
Leu His His Leu
                20
```

<210> 5

<211> 20

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

ES 2 908 978 T3

<400> 5  
 His Leu His His Leu Trp His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

<210> 6  
 <211> 20  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 6  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Trp His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 10 20

<210> 7  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 7  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Trp Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

20 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

25 <400> 8  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Trp  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

<210> 9  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 9  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Trp His His Leu  
 20

35 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

ES 2 908 978 T3

<400> 10  
 His Pro His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

<210> 11  
 <211> 20  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 11  
 His Leu His His Pro Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 10 20

<210> 12  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 12  
 His Leu His His Leu Pro His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

20 <210> 13  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

25 <400> 13  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Pro His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

<210> 14  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 14  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Pro His His Leu  
 20

35 <210> 15  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

ES 2 908 978 T3

<400> 15  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Pro  
 20

<210> 16  
 <211> 20  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 16  
 Glu Leu Glu Glu Leu Leu Glu Glu Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 10 Leu His His Leu  
 20

<210> 17  
 <211> 20  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 17  
 Glu Leu His His Leu Leu His Glu Leu Leu His Leu Leu His Glu Leu  
 1 5 10 15  
 20 Leu His His Leu  
 20

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 18  
 Gly Leu Trp Arg Ala Leu Trp Arg Leu Leu Arg Ser Leu Trp Arg Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Trp Arg Ala Cys  
 20

30 <210> 19  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

35 <400> 19  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg  
 20 25 30  
 Arg

<210> 20  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia Artificial

# ES 2 908 978 T3

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 20  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

5 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 21  
 His Trp His His Trp Trp His His Trp Trp His Trp Trp His His Trp  
 1 5 10 15  
 Trp His His Trp  
 20

<210> 22  
 <211> 20  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 22  
 His Leu His His Leu Leu His His Trp Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

20 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 23  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Trp His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Leu  
 20

30 <210> 24  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

35 <400> 24  
 His Leu His His Leu Leu His His Leu Leu His Leu Leu His His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu His His Trp  
 20

<210> 25  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia Artificial

ES 2 908 978 T3

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 25  
 His His His His His His His His His His Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Leu  
 20

5 <210> 26  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 10 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 26  
 His His His His His His His Leu Leu Leu Leu Leu Leu  
 1 5 10  
 <210> 27  
 <211> 15  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 27  
 Leu Thr Thr Leu Leu Thr Leu Leu Thr Thr Leu Leu Thr Thr Leu  
 1 5 10 15

20 <210> 28  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 28  
 Lys Leu Leu Lys Leu Leu Lys Leu Trp Leu Lys Leu Leu Lys Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Lys Leu Leu  
 20

30 <210> 29  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

35 <400> 29  
 Leu His Leu Leu His His Leu Leu His His Leu His His Leu Leu His  
 1 5 10 15  
 His Leu Leu His Leu Leu His His Leu Leu His His Leu  
 20 25

<210> 30  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 40 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 30  
 Phe Leu Gly Gly Ile Ile Ser Phe Phe Lys Arg Leu Phe  
 1 5 10

5 <210> 31  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

10 <400> 31  
 Phe Ile Gly Gly Ile Ile Ser Phe Ile Lys Lys Leu Phe  
 1 5 10

<210> 32  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 32  
 Phe Ile Gly Gly Ile Ile Ser Leu Ile Lys Lys Leu Phe  
 1 5 10

20 <210> 33  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

25 <400> 33  
 His Leu Leu His Leu Leu Leu His Leu Trp Leu His Leu Leu His Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu His Leu Leu  
 20

<210> 34  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 34  
 Gly Ile Gly Gly Ala Val Leu Lys Val Leu Thr Thr Gly Leu Pro Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Ser Trp Ile Lys Arg Lys Arg Gln Gln  
 20 25

35 <210> 35  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 35  
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15  
 Gly Gly

ES 2 908 978 T3

<210> 36  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 36  
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln  
 1 5 10

10 <210> 37  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

15 <400> 37  
 Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val  
 20

<210> 38  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 38  
 Gly Gly Gly Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala  
 1 5 10 15  
 Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala Ala Lys Ala Ala Arg Lys Lys Ala  
 20 25 30  
 Ala Lys Ala Ala Lys  
 35

25 <210> 39  
 <211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

30 <400> 39  
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Lys Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu  
 20 25

<210> 40  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 40  
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg  
 1 5

40 <210> 41  
 <211> 31

ES 2 908 978 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

5 <400> 41  
 Trp Glu Ala Lys Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys His  
 1 5 10 15  
 Ile Leu Ala Lys Ala Leu Ala Lys Ala Leu Lys Ala Cys Glu Ala  
 20 25 30

<210> 42  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 42  
 Trp Glu Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu His  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala  
 20 25 30

<210> 43  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<220>  
 <221> VARIANTE  
 25 <222> 2, 4, 6, 8, 10, 12  
 <223> Xaa = norleucina

<220>  
 <221> HIDRATO DE CARBONO  
 <222> (1)...(1)  
 30 <223> NHC12H25

<400> 43  
 Asp Xaa Lys Xaa Lys Xaa His Xaa Lys Xaa His Xaa  
 1 5 10

<210> 44  
 <211> 21  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 44  
 Lys Leu Leu Lys Leu Leu Leu Lys Leu Trp Leu Lys Leu Leu Lys Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Lys Leu Leu  
 40 20

<210> 45  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

45 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

ES 2 908 978 T3

<400> 45  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly  
 20

<210> 46  
 <211> 24  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 46  
 Gly Leu Phe His Ala Ile Ala Ala His Phe Ile His Gly Gly Trp His  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ile His Gly Trp Tyr Gly  
 10 20

<210> 47  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 47  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Glu Phe Ile Glu Gly Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Glu Gly Trp Tyr Gly  
 20

20 <210> 48  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

25 <400> 48  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly  
 20

<210> 49  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 49  
 Gly Leu Phe Lys Ala Ile Ala Lys Phe Ile Lys Gly Gly Trp Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Lys Gly Trp Tyr Gly  
 20

35 <210> 50  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 40 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 50  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg  
 20 25 30  
 Arg

5 <210> 51  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 51  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn  
 20 25 30  
 Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Gly Gly  
 35 40

10 <210> 52  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 52  
 Gly Leu Phe His Ala Ile Ala Ala His Phe Ile His Gly Gly Trp His  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Ile His Gly Trp Tyr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln  
 20 25 30  
 Arg Arg

20 <210> 53  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

25 <400> 53  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Ala Glu Phe Ile Glu Gly Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Glu Gly Trp Tyr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg  
 20 25 30  
 Arg

30 <210> 54  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 54  
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg  
 20 25 30  
 Arg

35 <210> 55  
 <211> 33

<212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

5 <400> 55  
 Gly Leu Phe Lys Ala Ile Ala Lys Phe Ile Lys Gly Gly Trp Lys Gly  
 1 5 10 15  
 Leu Ile Lys Gly Trp Tyr Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg  
 20 25 30  
 Arg

<210> 56  
 <211> 33

<212> PRT  
 10 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 56  
 Gly Phe Phe Ala Leu Ile Pro Lys Ile Ile Ser Ser Pro Leu Phe Lys  
 1 5 10 15  
 Thr Leu Leu Ser Ala Val Gly Ser Ala Leu Ser Ser Ser Gly Glu Gln  
 20 25 30  
 Glu

15 <210> 57  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

<400> 57  
 Leu His Leu Leu His His Leu Leu His His Leu His His Leu Leu His  
 1 5 10 15  
 His Leu Leu His Leu Leu His His Leu Leu His His Leu Gly Gly Gly  
 20 25 30  
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln  
 35 40

25 <210> 58  
 <211> 44  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

30 <400> 58  
 Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln Gly Gly Gly Leu  
 1 5 10 15  
 His Leu Leu His His Leu Leu His His Leu His His Leu Leu His His  
 20 25 30  
 Leu Leu His Leu Leu His His Leu Leu His His Leu  
 35 40

<210> 59  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>  
 <223> Secuencia de aminoácidos completamente sintética

ES 2 908 978 T3

<400> 59

Leu Ile Arg Leu Trp Ser His Ile His Ile Trp Phe Gln Trp Arg Arg  
1 5 10 15  
Leu Lys Trp Lys Lys Lys  
20

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición modular que comprende
  - 1) un siRNA;
  - 2) uno o más conectores, que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de la Tabla 2, donde los conectores están unidos a la hebra guía del siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa excluyendo las posiciones terminales 3' y/o 5' de la hebra guía, o donde los conectores están unidos a la hebra retardada del siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa excluyendo las posiciones terminales 3' y/o 5' de la hebra retardada; y
  - 3) uno o más péptidos, que pueden ser iguales o diferentes, seleccionados de SEQ ID NO: 28, 29, 33, 36, 40, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58 y 59, en donde los péptidos están unidos a los conectores.
- 5
- 10 2. La composición modular según la reivindicación 1, que comprende además colesterol, en la que el colesterol está unido al siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa o en la posición 3' del siRNA.
3. La composición modular según la reivindicación 1, que comprende además colesterol, en la que el colesterol está unido al siRNA en la posición 2' de los anillos de ribosa y/o en las posiciones terminales 3' y/o 5' del siRNA.

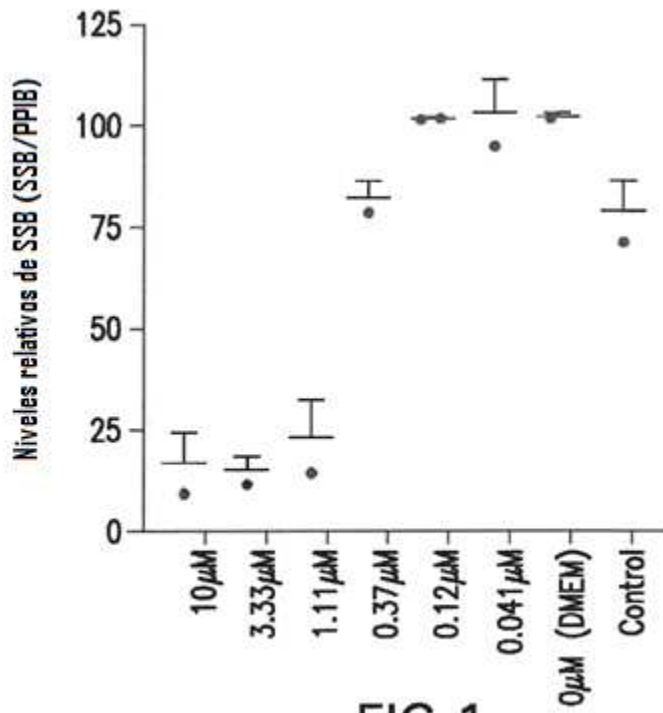


FIG.1

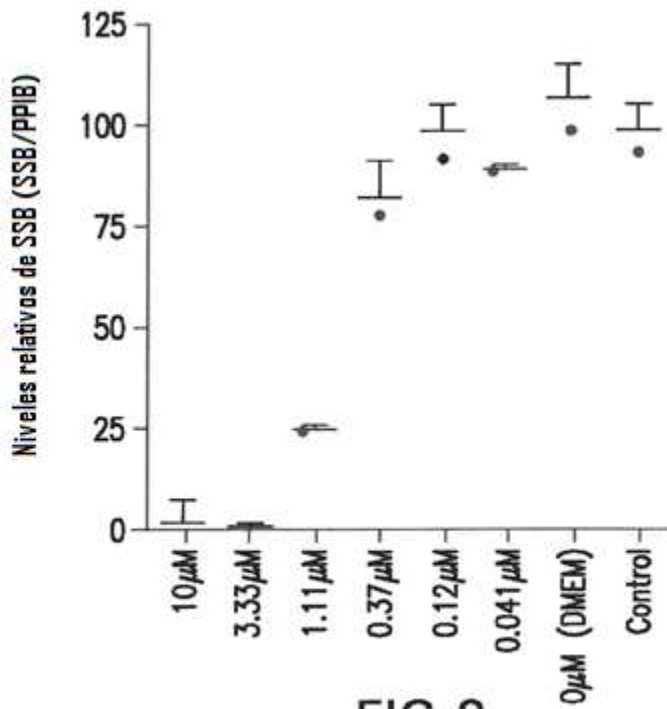
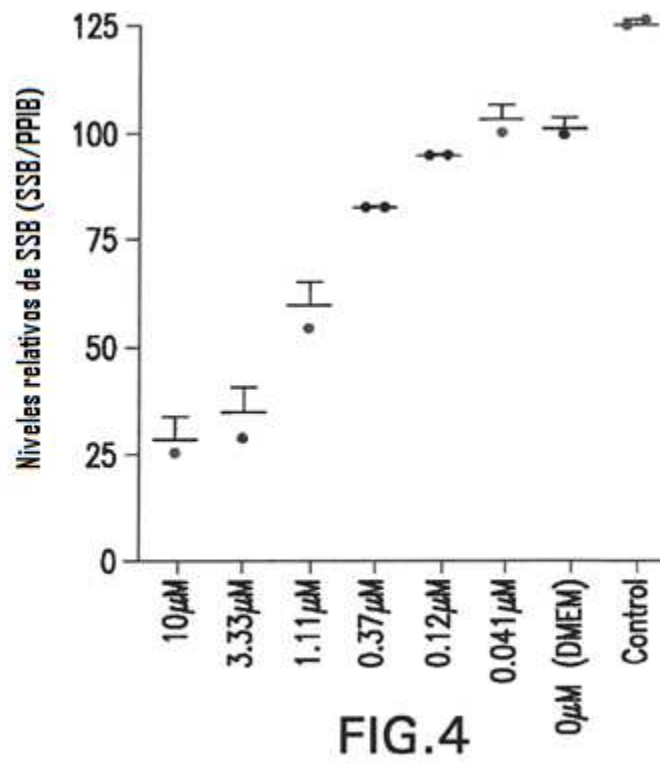
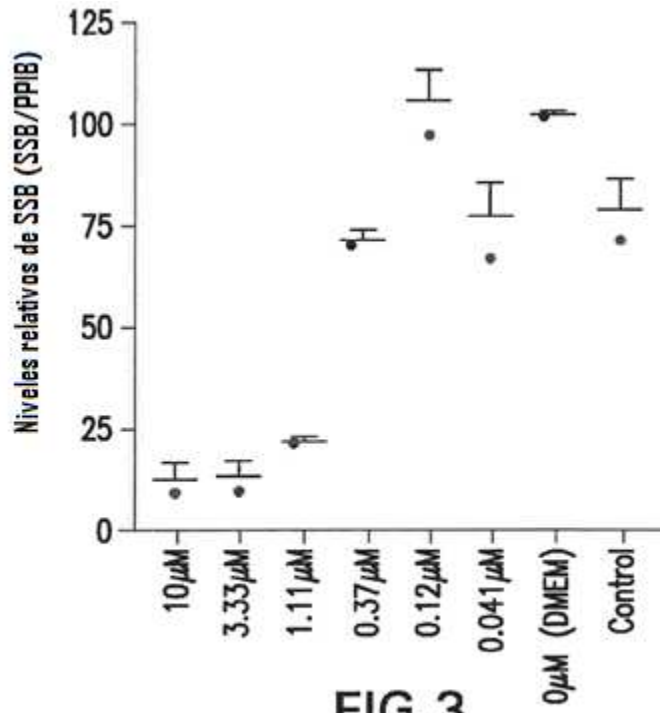


FIG.2



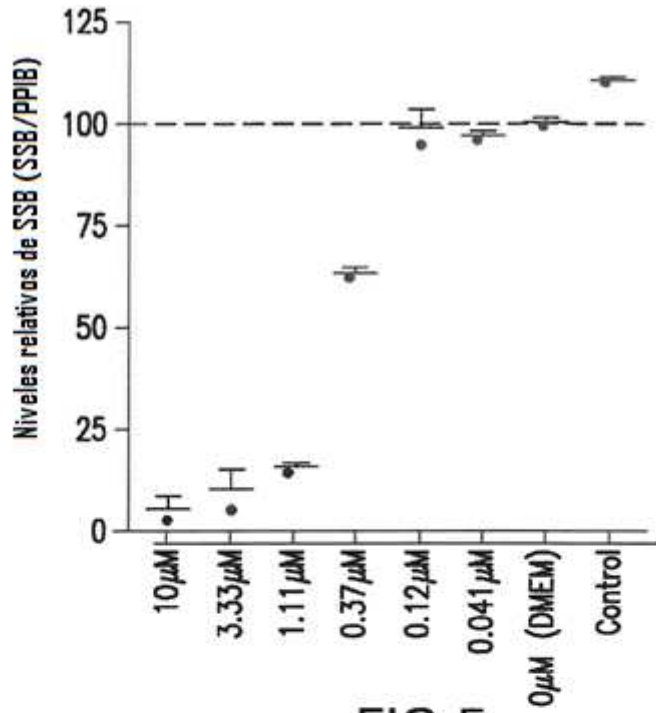


FIG. 5

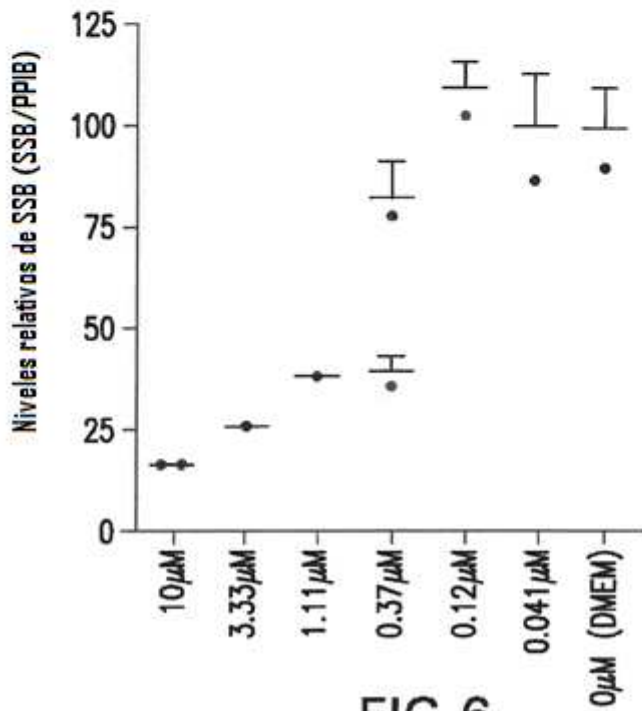


FIG. 6

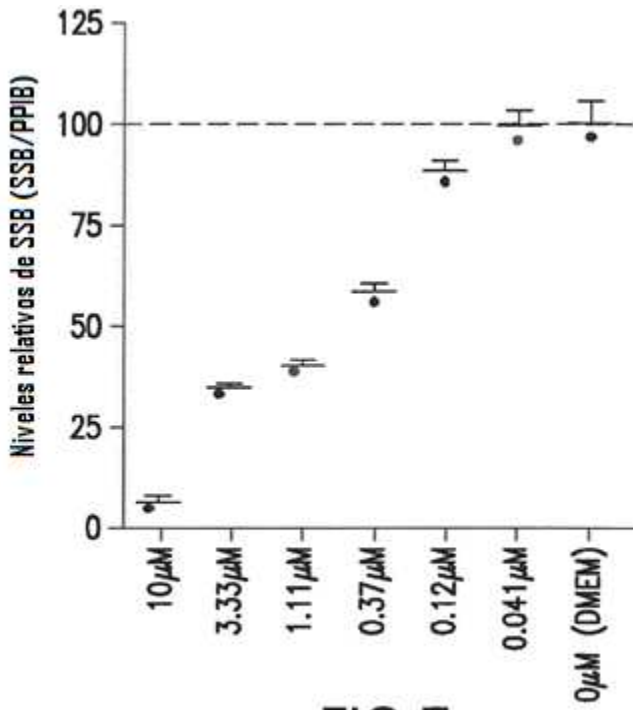


FIG. 7

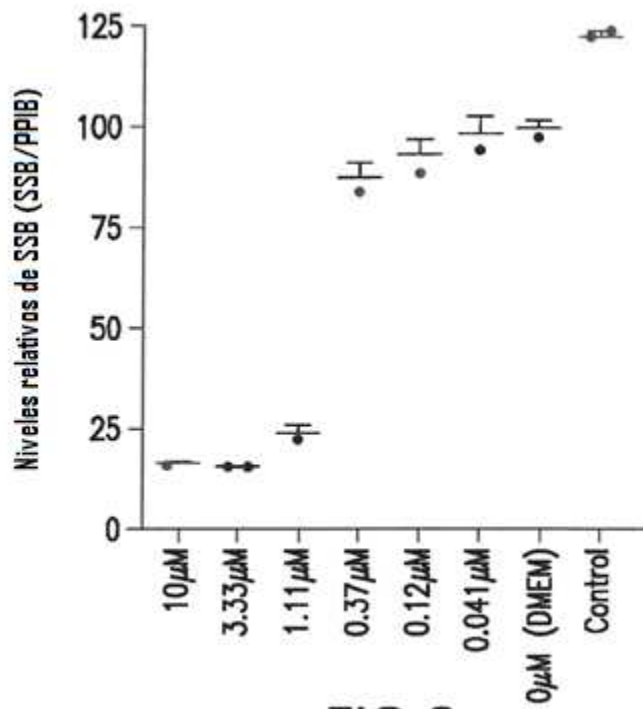


FIG. 8

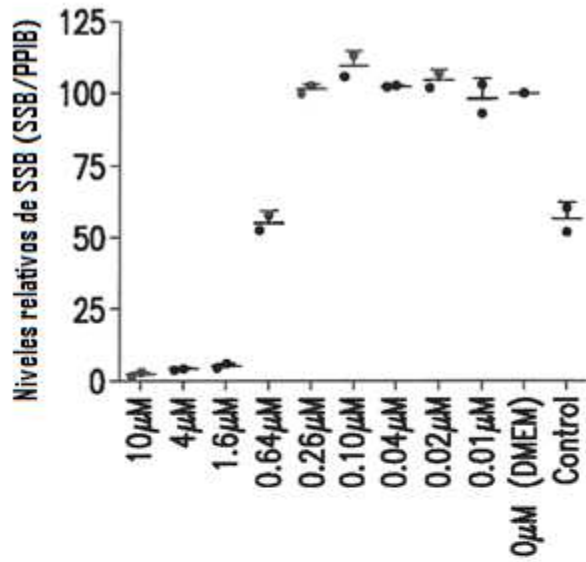


FIG. 9

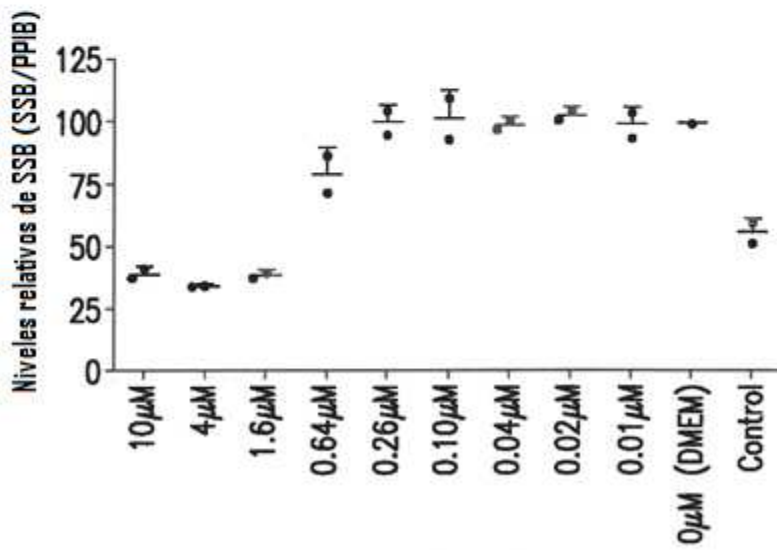


FIG. 10

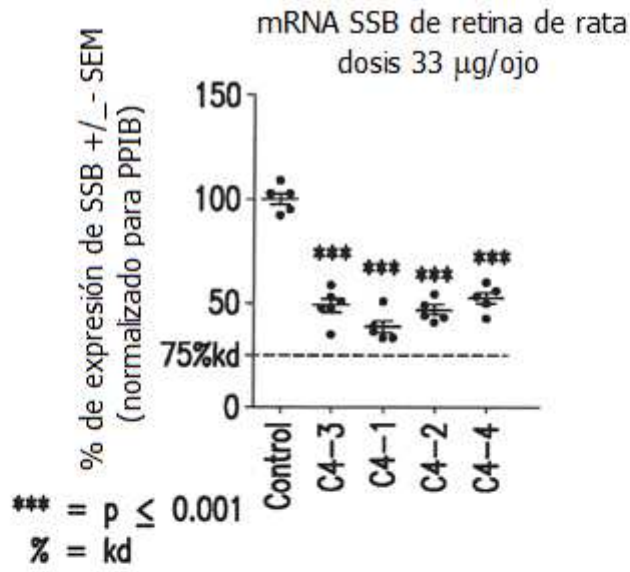


FIG.11A

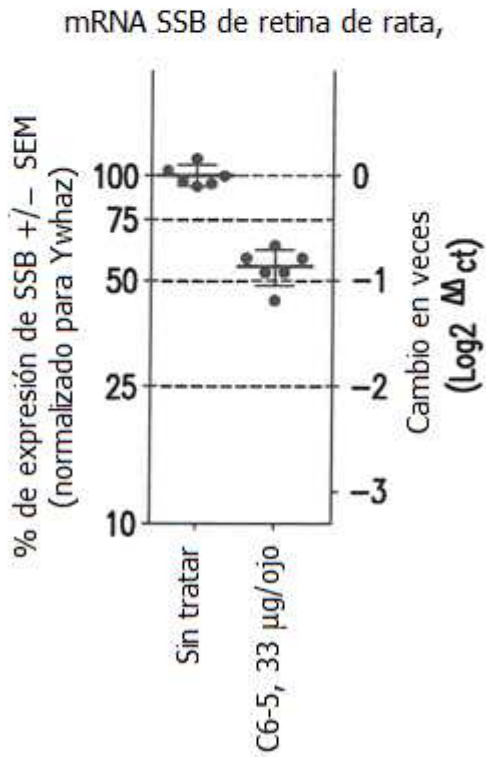


FIG.11B

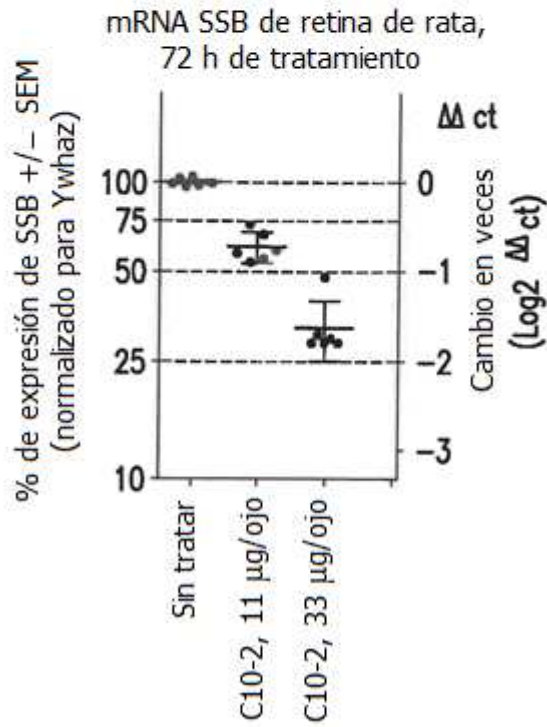


FIG.11C