

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 987 915**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

C07C 211/63 (2006.01)

C12N 15/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2011 E 21171748 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2024 EP 3943114**

54 Título: **Nuevos lípidos catiónicos de bajo peso molecular para el suministro de oligonucleótidos**

30 Prioridad:

20.09.2010 US 38448610 P

02.08.2011 US 201161514270 P

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

18.11.2024

73 Titular/es:

SIRNA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)

300 Third Street

Cambridge MA 02142, US

72 Inventor/es:

STANTON, MATTHEW G.;

BUDZIK, BRIAN W.;

BEUTNER, GREGORY L. y

LIAO, HONGBIAO

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 987 915 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

Nuevos lípidos catiónicos de bajo peso molecular para el suministro de oligonucleótidos

La presente invención se refiere a un método para la preparación de nuevos lípidos catiónicos que se pueden usar en combinación con otros componentes lipídicos, tales como el colesterol y los PEG-lípidos para formar nanopartículas lipídicas con oligonucleótidos, para facilitar la captación celular y el escape endosómico, y para eliminar el ARNm diana *in vitro* e *in vivo*.

Los lípidos catiónicos y el uso de lípidos catiónicos en nanopartículas lipídicas para el suministro de oligonucleótidos, en particular ARNip y miARN, se han descrito previamente. Las nanopartículas de lípidos y el uso de nanopartículas de lípidos para el suministro de oligonucleótidos, en particular ARNip y miARN, se han descrito previamente. Los oligonucleótidos (incluidos ARNip y miARN) y la síntesis de oligonucleótidos se han descrito previamente (consúltense las solicitudes de patente de EE. UU.: US 2006/0083780, US 2006/0240554, US 2008/0020058, US 2009/0263407 y US 2009/0285881, y las solicitudes de patente PCT: WO 2009/086558, WO2009/127060, WO2009/132131, WO2010/042877, WO2010/054384, WO2010/054401, WO2010/054405 y WO2010/054406). Ver también Semple S. C. *et al.*, Rational design of cationic lipids for siRNA delivery, Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176.

Otros lípidos catiónicos se describen en las solicitudes de patente de EE. UU.: US 2009/0263407, US 2009/0285881, US 2010/0055168, US 2010/0055169, US 2010/0063135, US 2010/0076055, US 2010/0099738 y US 2010/0104629.

Se han empleado lípidos catiónicos tradicionales, tales como CLinDMA y DLinDMA, para el suministro de ARNip al hígado, pero adolecen de una eficacia de suministro no óptima junto con toxicidad hepática a dosis más altas. Es un objeto de la presente invención proporcionar un método de preparación de un andamiaje de lípidos catiónicos que demuestre una eficacia mejorada junto con una toxicidad hepática más baja como resultado de niveles de lípidos más bajos en el hígado. Los lípidos catiónicos de bajo peso molecular con una cadena de lípido corta preparados según el método de la presente invención mejoran la eficacia y la tolerabilidad del suministro *in vivo* de ARNip. Algunos lípidos útiles para fabricar nanopartículas para la administración de oligonucleótidos se describen en Koynova (2009); Mol. Pharmaceutics 6(3):951-958; y en Lin Zhu (2010); Exp. Op. Drug Delive. 7(10):1209-1226. Es un objeto de la presente invención

un andamiaje de lípidos catiónicos que demuestre una eficacia Los lípidos catiónicos de bajo peso molecular con una cadena de lípido corta preparados según el método de la presente invención mejoran la eficacia y la tolerabilidad del suministro *in vivo* de ARNip.

Figuras

Figura 1: Eficacia de LNP (compuesto 1) en ratones.

Figura 2. Eficacia de LNP (compuestos 32 y 33) en rata (ARNip de ApoB).

Figura 3. Niveles de lípidos catiónicos (compuestos 32 y 33) en hígado de rata.

Figura 4. Eficacia de LNP (compuesto 32 y 33, ARNip de ApoB) en NHP.

Figura 5. Eficacia de LNP (compuesto 32 y 33, ARNip de β -catenina) en NHP.

Figura 6. Niveles máximos de ALT en NHP después de la dosis de LNP (compuestos 32 y 33).

Figura 7. Niveles de lípidos catiónicos (compuestos 32 y 33) en hígado NHP.

Figura 8. KD de ARNm de β -catenina de hígado en ratones TRE-Met (compuesto 33).

Figura 9. KD de ARNm de β -catenina tumoral en ratones TRE-Met (compuesto 33).

Figura 10. Inhibición del crecimiento tumoral (compuesto 33) en ratones TRE-met.

Figura 11. Eficacia de LNP (compuestos 32 y 33) en ratones.

Figura 12. KD de ARNm de β -catenina de hígado en ratones TRE-Met (compuesto 32).

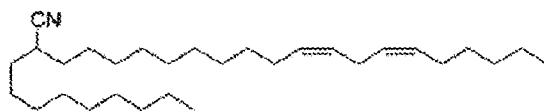
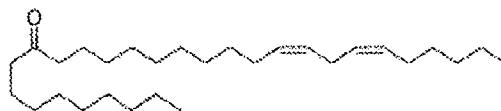
Figura 13. KD de ARNm de β -catenina tumoral en ratones TRE-Met (compuesto 32).

Figura 14. Inhibición del crecimiento tumoral (compuesto 32) en ratones TRE-met.

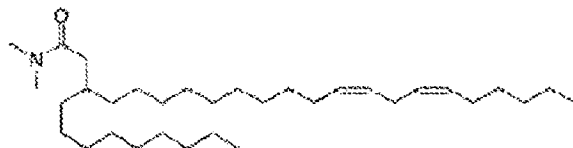
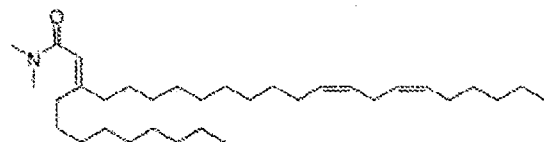
En una primera realización de esta invención, un método para la preparación de un lípido catiónico, o cualquier sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado entre:

(20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosa-20,23-dien-10-amina (Compuesto 1);

- (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracosa-15,18-dien-5-amina (Compuesto 9);
 (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricosa-14,17-dien-4-amina (Compuesto 10);
 (19Z,22Z)-N,N-dimetiloctacosa-19,22-dien-9-amina (Compuesto 11);
 (18Z,21Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-8-amina (Compuesto 12);
 5 17Z,20Z)-N,N-dimetilhexacosa-17,20-dien-7-amina (Compuesto 13);
 (16Z,19Z)-N,N-dimetilpentacosa-16,19-dien-6-amina (Compuesto 14);
 (20Z,23Z)-N-etil-N-metilnonacosa-20,23-dien-10-amina (Compuesto 21);
 1-[(11Z, 14Z) -1-nonilicosa-11,14-dien-1-il]pirrolidina (Compuesto 22) ;
 (12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicosa-12,15-dien-1-amina (Compuesto 31);
 10 (13Z, 16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (Compuesto 32);
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptadecan-8-amina (Compuesto 33);
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]hexadecan-8-amina (Compuesto 38);
 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]pentadecan-8-amina (Compuesto 43); y
 (11E, 20Z, 23Z) -N, N-dimetilnonacosa-11,20,23-trien-10-amina (Compuesto 44) ;
 15 usando uno o más compuestos intermedios seleccionados de las fórmulas ii, iii, v, vii, viii, x y xv

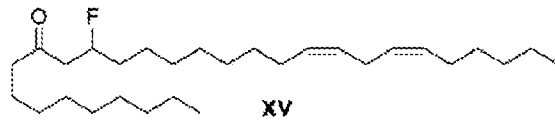


20



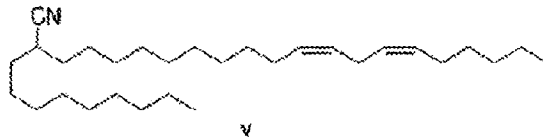
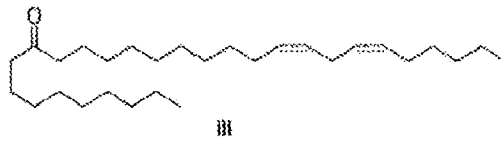
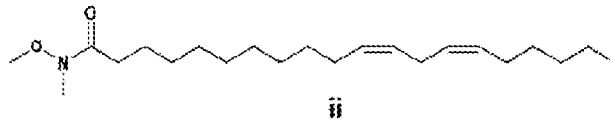
25



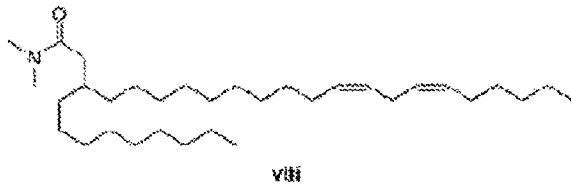
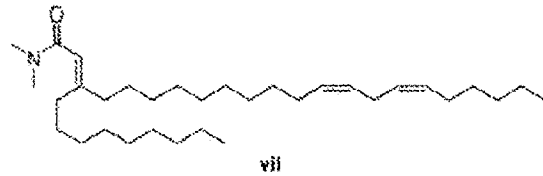


En una segunda realización de esta invención, se proporciona un compuesto seleccionado de las Fórmulas ii, iii, v, vii, viii, x y xv

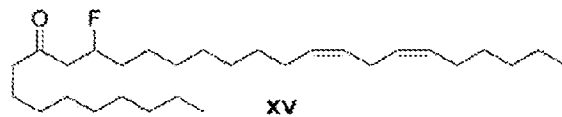
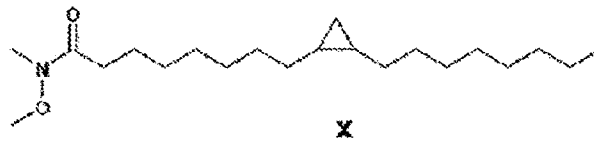
5



10



15



Detalles técnicos

20 Los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención son útiles en la preparación de nanopartículas lipídicas.

Los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el suministro de oligonucleótidos.

25 Los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el suministro de ARNip y miARN.

Los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención son componentes útiles en una nanopartícula lipídica para el suministro de ARNip.

Los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención pueden tener centros asimétricos, ejes quirales y planos quirales (como se describe en: E.L. Eliel y S.H. Wilen, Stereochemistry of Carbon Compounds, John Wiley & Sons, Nueva York, 1994, pp. 1119-1190), y se presentan como racematos, mezclas racémicas y como diastereómeros individuales, incluyéndose en la presente invención todos los isómeros posibles y mezclas de los mismos, incluidos los isómeros ópticos. Además, los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención pueden existir como tautómeros y se pretende que ambas formas tautoméricas queden abarcadas por el alcance de la invención, incluso aunque solo se represente una estructura tautomérica.

En los componentes preparados según la presente invención, los átomos pueden mostrar sus abundancias isotópicas naturales, o uno o más de los átomos pueden enriquecerse artificialmente en un isótopo particular que tiene el mismo número atómico, pero una masa atómica o un número másico diferente de la masa atómica o número másico que se encuentra predominantemente en la naturaleza. La presente invención pretende incluir el método de preparación de todas las variaciones isotópicas adecuadas de los compuestos. Por ejemplo, diferentes formas isotópicas del hidrógeno (H) incluyen protio (^1H) y deuterio (^2H). El protio es el isótopo de hidrógeno predominante que se encuentra en la naturaleza. El enriquecimiento en deuterio puede ofrecer ciertas ventajas terapéuticas, como aumentar la semivida *in vivo* o la reducción de los requisitos de dosificación, o puede proporcionar un compuesto útil como patrón para la caracterización de muestras biológicas. Los compuestos enriquecidos isotópicamente dentro de la fórmula A pueden prepararse sin experimentación innecesaria mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica o mediante procesos análogos a los descritos en el esquema y los ejemplos de este documento usando intermedios y/o reactivos intermedios enriquecidos isotópicamente apropiados.

En el método de la presente invención se incluye la forma libre de los lípidos catiónicos preparados, así como los estereoisómeros y sales farmacéuticamente aceptables de los mismos. Algunos de los lípidos catiónicos específicos aislados ejemplificados en este documento son las sales protonadas de lípidos catiónicos de amina. La expresión "forma libre" se refiere a los lípidos catiónicos de amina en forma no salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluidas no solo incluyen las sales aisladas ejemplificadas para los lípidos catiónicos específicos descritos en este documento, sino también todas las sales farmacéuticamente aceptables típicas de la forma libre de lípidos catiónicos de fórmula A. La forma libre de los lípidos catiónicos de la sal específica descrita puede ser aislada usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, la forma libre puede regenerarse tratando la sal con una disolución de base acuosa diluida adecuada, tal como NaOH, carbonato de potasio, amoníaco y bicarbonato de sodio acuoso diluido. Las formas libres pueden ser ligeramente diferentes de sus respectivas formas de sal con respecto a ciertas propiedades físicas, tales como la solubilidad en disolventes polares, pero las sales de ácidos y de bases son, por lo demás, farmacéuticamente equivalentes a sus respectivas formas libres para los fines de la invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los presentes lípidos catiónicos se pueden sintetizar a partir de los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención en el presente documento que contienen un resto básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, las sales de los lípidos catiónicos básicos se preparan mediante cromatografía de intercambio iónico o haciendo reaccionar la base libre con cantidades estequiométricas o con un exceso del ácido orgánico o inorgánico formador de sal deseado en un disolvente adecuado o diversas combinaciones de disolventes. De manera similar, las sales de los compuestos ácidos se forman mediante reacciones con la base orgánica o inorgánica apropiada.

Por tanto, las sales farmacéuticamente aceptables de los lípidos catiónicos de esta invención incluyen las sales no tóxicas convencionales de los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención formados por la reacción de un lípido catiónico básico de la presente con un ácido orgánico o inorgánico. Por ejemplo, las sales no tóxicas convencionales incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares, así como sales preparadas a partir de ácidos orgánicos, tales como ácido acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluensulfónico, metansulfónico, etandisulfónico, oxálico, isetiónico, trifluoroacético (TFA) y similares.

Cuando los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención son ácidos, las "sales farmacéuticamente aceptables" adecuadas se refieren a sales preparadas a partir de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables que incluyen bases inorgánicas y bases orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen aluminio, amonio, calcio, cobre, férricas, ferrosas, litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, potasio, sodio, zinc y similares. Particularmente preferidas son las sales de amonio, calcio, magnesio, potasio y sodio. Las sales derivadas de bases orgánicas no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, aminas sustituidas que incluyen aminas sustituidas de origen natural, aminas cíclicas y resinas de intercambio iónico básicas, tales como arginina, betaina, cafeína, colina, N,N'-dibenciletildiamina, dietilamina, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, isopropilamina, lisina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piperidina, resinas de poliamina, procaína, purinas, teobromina, trietilamina, trimetilamina, tripropilamina, trometamina y similares.

La preparación de las sales farmacéuticamente aceptables descritas anteriormente y otras sales farmacéuticamente aceptables típicas se describe con más detalle por Berg *et al.*, *Pharmaceutical Salts*, J. Pharm. Sci., 1977, 66:1-19.

5 También se observará que los lípidos catiónicos preparados según el método de la presente invención son potencialmente sales internas o bipolares, ya que, en condiciones fisiológicas, un resto ácido desprotonado en el compuesto, tal como un grupo carboxilo, puede ser aniónico, y esta carga electrónica podría entonces equilibrarse internamente frente a la carga catiónica de un resto básico protonado o alquilado, tal como un átomo de nitrógeno cuaternario.

Ejemplos

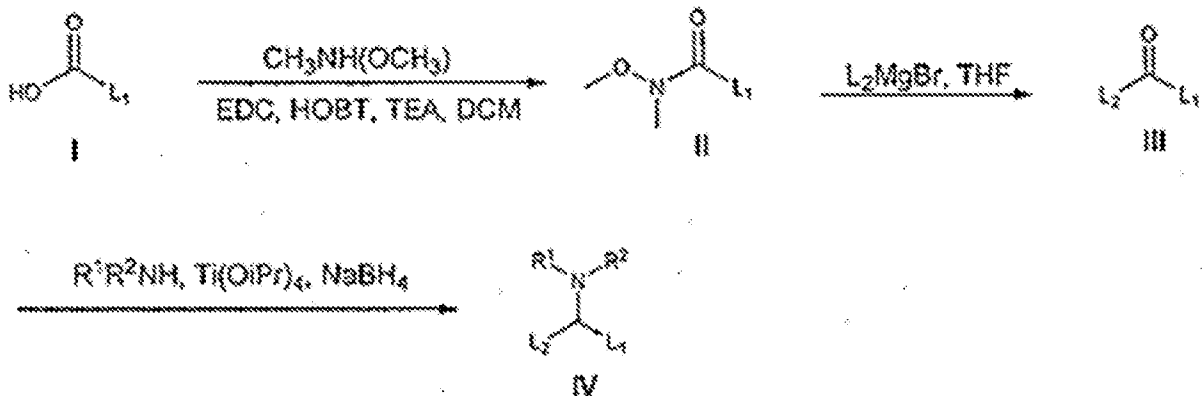
10 La descripción técnica que se establece a continuación puede, en algunos aspectos, ir más allá del alcance de las reivindicaciones. Los elementos de la descripción que no entran dentro del alcance de las reivindicaciones se proporcionan a título informativo.

15 Los ejemplos proporcionados están destinados a ayudar a una mayor comprensión de la invención. Se pretende que los materiales, especies y condiciones particulares empleados sean más ilustrativos de la invención limitan el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Los reactivos utilizados para sintetizar los lípidos catiónicos están disponibles en el mercado o los expertos en la técnica los prepararán fácilmente. En este contexto, los compuestos 2 a 8, 15 a 20, 23 a 30, 34 a 37 y 39 a 42 representan ejemplos de referencia.

La síntesis de los nuevos lípidos catiónicos es un proceso lineal que comienza a partir del ácido lipídico (I). El acoplamiento a N,O-dimetilhidroxilamina produce la amida de Weinreb II. La adición de Grignard genera cetonas III. La aminación reductora mediada por titanio produce productos finales de tipo IV.

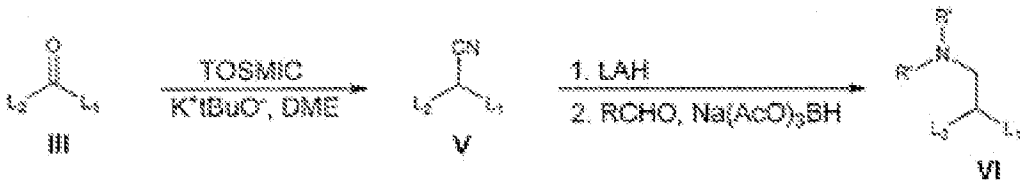
20

ESQUEMA GENERAL 1



25 La síntesis de los lípidos catiónicos homologados de un solo carbono V es un proceso lineal que comienza a partir de la cetona lipídica (III). Conversión de la cetona en nitrilo (V) se logra mediante el tratamiento con TOSMIC y *tert*-butóxido de potasio. La reducción del nitrilo a la amina primaria, seguida de una aminación reductora, proporciona los lípidos catiónicos finales VI.

ESQUEMA GENERAL 2



30 La síntesis de dos lípidos catiónicos homologados de carbono IX es un proceso lineal que comienza a partir de la cetona lipídica (III). La conversión de la cetona en la amida α, β -insaturada VII se logra en las condiciones de Peterson. La reducción conjugada de la insaturación α, β se realiza usando LS-selectrida para dar la amida VIII. La reducción de la amida con hidruro de litio y aluminio proporciona lípidos catiónicos finales IX.

ESQUEMA GENERAL 3



Los lípidos que contienen ciclopipilo se preparan según el esquema general 4. Se someten amidas de Weinreb insaturadas II a condiciones de ciclopropanación de Simmons-Smith para obtener amidas de Weinreb que contienen ciclopipilo X. Estas se transforman en los productos finales como se describe en los esquemas generales 1-3.

5

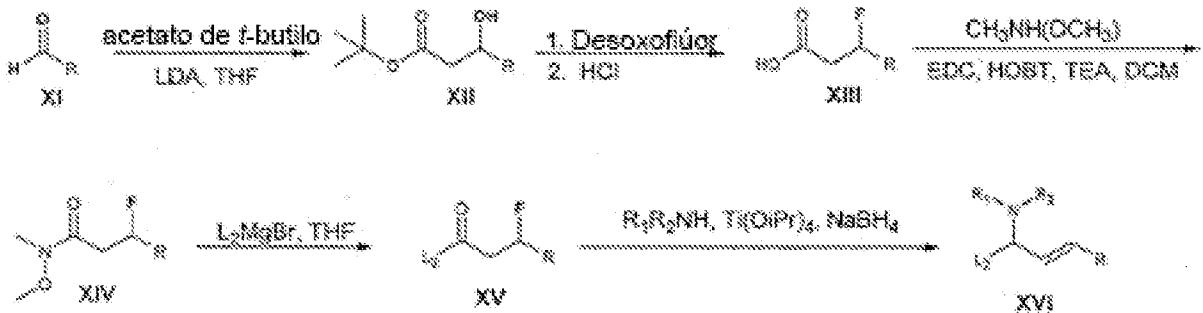
ESQUEMA GENERAL 4



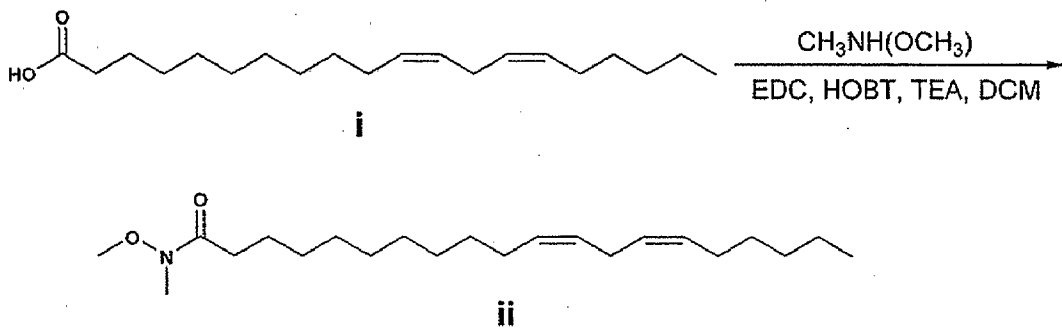
La síntesis de lípidos catiónicos de aminas alílicas XVI es un proceso lineal que comienza con el aldehído XI. Además de acetato de *t*-butilo, se genera el β-hidroxiéster XII. La conversión de la funcionalidad hidroxilo en un grupo fluoro, seguida de un tratamiento con ácido genera el β-fluoroácido XIII. La conversión del ácido en la amida de Weinreb, seguida de la adición de Grignard, produce la β-fluorocetona XV. La aminación reductora da como resultado la eliminación simultánea para generar la amina alílica deseada XVI.

10

ESQUEMA GENERAL 5



(20Z,23Z)-N,N-dimetil-20,23-nonacosadien-10-amina (compuesto 1)



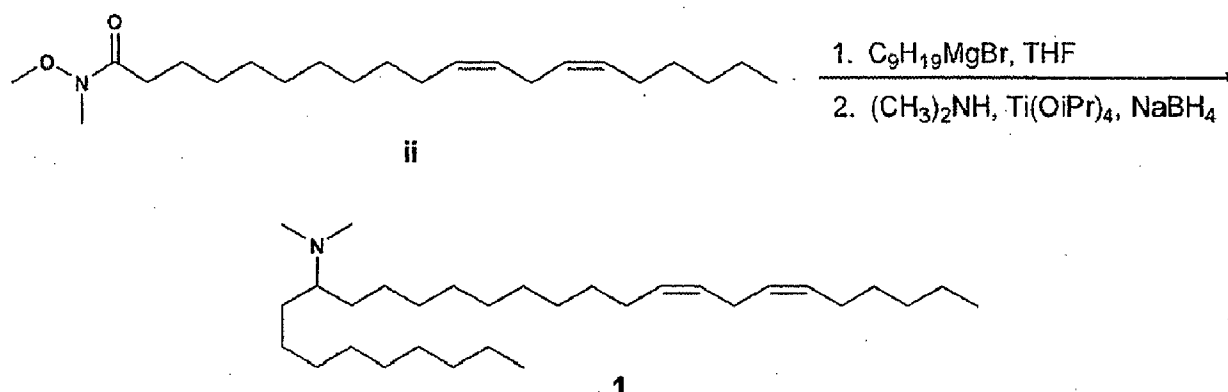
15

El ácido (11Z,14Z)-11,14-eicosadienoico (50 g, 162 mmol), *N,O*-clorhidrato de dimetilhidroxilamina (31,6 g, 324 mmol), HOAt (44,1 g, 324 mmol), Et₃N (45,2 ml, 324 mmol) y EDC (62,1 g, 324 mmol) se mezclaron en DCM (810 ml) y se agitaron durante la noche a temperatura ambiente. Después, la reacción se lavó 5 x 700 ml de agua, luego se lavó 1 x 600 ml de NaOH 1 M, se secó con sulfato de sodio, se filtró a través de celite y se evaporó para obtener 53,06 g (93 %)

20

de (11Z,14Z)-*N*-metoxi-*N*-metil-11,14-eicosadienamida como un aceite de color dorado claro. RMN de ¹H (400

MHz, CDCl₃) δ 5,35 (m, 4H), 3,68 (s, 3H), 3,18 (s, 3H), 2,77 (m, 2H), 2,41 (t, *J* = 7 Hz, 2H), 2,05 (m, 4H), 1,63 (m, 2H), 1,40-1,26 (m, 18H), 0,89 (t, *J* = 7 Hz, 3H).

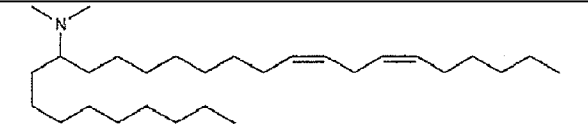
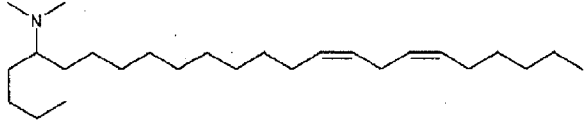
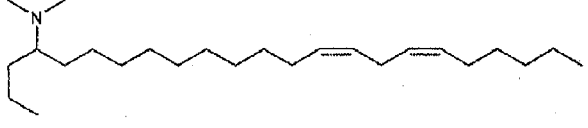
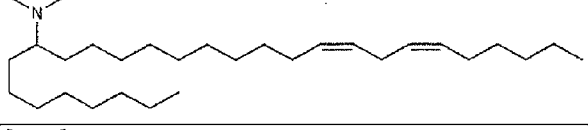
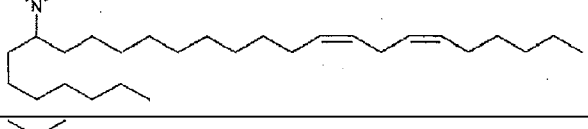
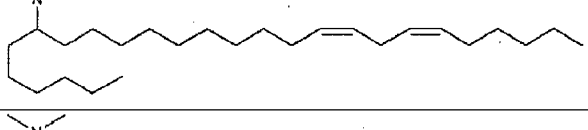
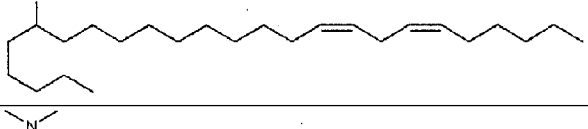
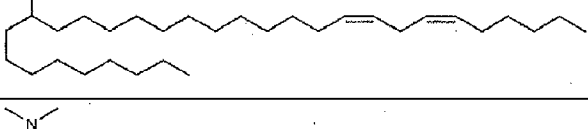
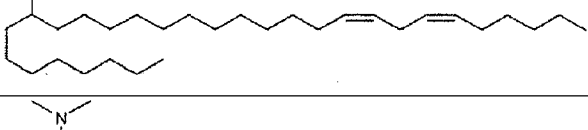
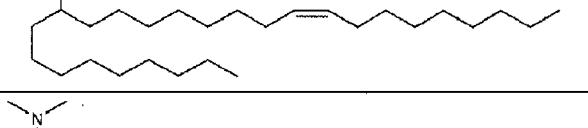
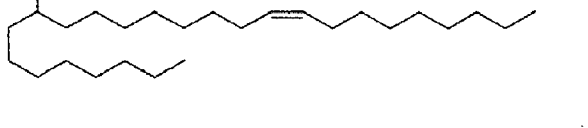
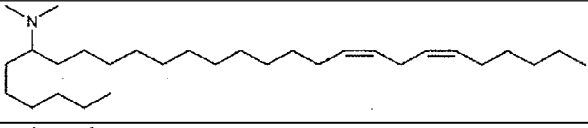
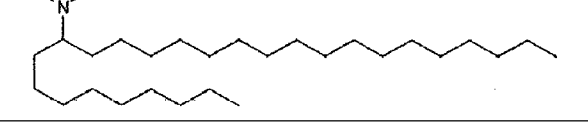


5 La (11Z,14Z)-*N*-metoxi-*N*-metil-11,14-eicosadienamida (4 g, 11,38 mmol) se disolvió en THF seco (50,0 ml) en un
matraz de 250 ml y luego se añadió bromuro de nonilnagnesio 1 M (22,76 ml, 22,76 mmol) en nitrógeno a temperatura
ambiente. Después de 10 min, la reacción se inactivó lentamente con una disolución acuosa saturada
10 en exceso de NH₄Cl. La reacción se lavó en un embudo de decantación con hexano y agua, se agitó, se desechó la
capa acuosa inferior, se secó la capa superior con sulfato de sodio, se filtró y se evaporó para dar cetona bruta como
un aceite dorado. A la cetona bruta anterior se le añadió dimetilamina (2 M en THF) (14,22 ml, 28,4 mmol), seguido
de Ti(*O*-*i*-Pr)₄ (6,67 ml, 22,76 mmol) y se dejó en agitación durante la noche. Al día siguiente, se añadió EtOH (50 ml),
seguido de NaBH₄ (0,646 g, 17,07 mmol). Después de 5 minutos de agitación, se inyectó directamente toda la reacción
15 en una columna de sílice de 40 g que estaba en línea con una columna de sílice de 330 g. Se eluyó durante 10 min
con DCM al 100 %, luego durante 30 min con MeOH al 0-15 %/DCM, y se recogió (20Z,23Z)-*N,N*-dimetil-20,23-
nonacosadien-10-amina (1) (2,45 g, 5,47 mmol, rendimiento del 48,1 %) como un aceite ligeramente dorado. RMN
de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5,35 (m, 4H), 2,78 (m, 2H), 2,23 (m, 1H), 2,21 (s, 6H), 2,05 (m, 4H), 1,45-1,16 (m, 38H),
0,89 (m, 6H). HRMS calculado para C₃₁H₆₁N, 448,4877; encontrado 448,4872.

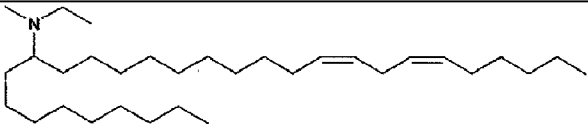
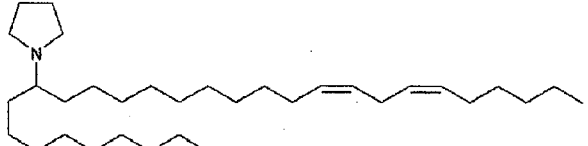
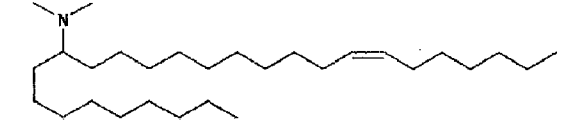
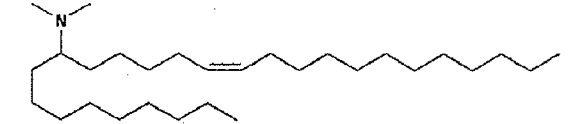
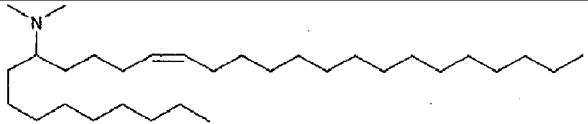
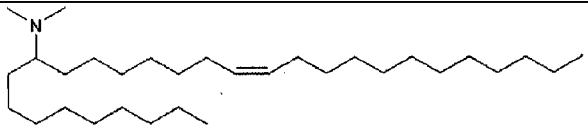
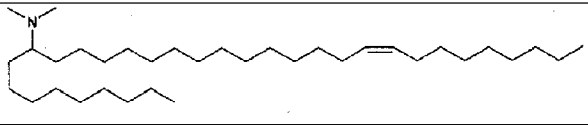
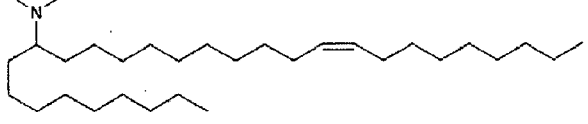
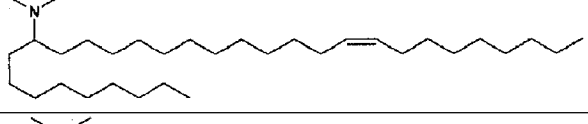
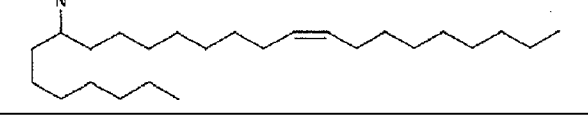
Los compuestos 2-30 son nuevos lípidos catiónicos y se prepararon según el Esquema general 1 anterior.

Compuesto	Estructura	HRMS
2		C ₂₈ H ₅₆ N calculado, 406,4407; encontrado 406,4405.
3		C ₂₇ H ₅₄ N calculado, 392,4251; encontrado 392,4250.
4		C ₂₄ H ₄₈ N calculado, 350,3781; encontrado 350,3770.
5		C ₂₃ H ₄₆ N calculado, 336,3625; encontrado 336,3613.
6		C ₂₅ H ₅₀ N calculado, 364,3938; encontrado 364,3941.
7		C ₂₆ H ₅₂ N calculado, 378,4094; encontrado 378,4081.

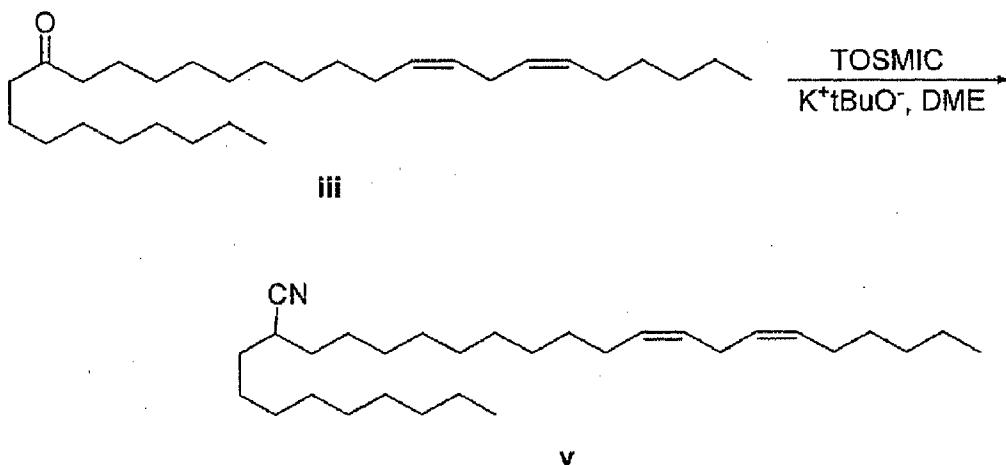
ES 2 987 915 T3

8		C29H58N calculado, 420,4564; encontrado 420,4562.
9		C26H52N calculado, 378,4094; encontrado 378,4089.
10		C25H50N calculado, 364,3938; encontrado 364,3931.
11		C30H60N calculado, 434,4720; encontrado 434,4717.
12		C29H58N calculado, 420,4564; encontrado 420,4561.
13		C28H56N calculado, 406,4407; encontrado 406,4404.
14		C27H54N calculado, 392,4251; encontrado 392,4245.
15		C33H66N calculado, 476,5190; encontrado 476,5196.
16		C32H64N calculado, 462,5033; encontrado 462,5045.
17		C29H59N calculado, 422,4720; encontrado 422,4726.
18		C28H57N calculado, 408,4564; encontrado 408,4570.
19		C30H59N calculado, 434,4720; encontrado 434,4729.
20		C29H61N calculado, 424,4877; encontrado 424,4875.

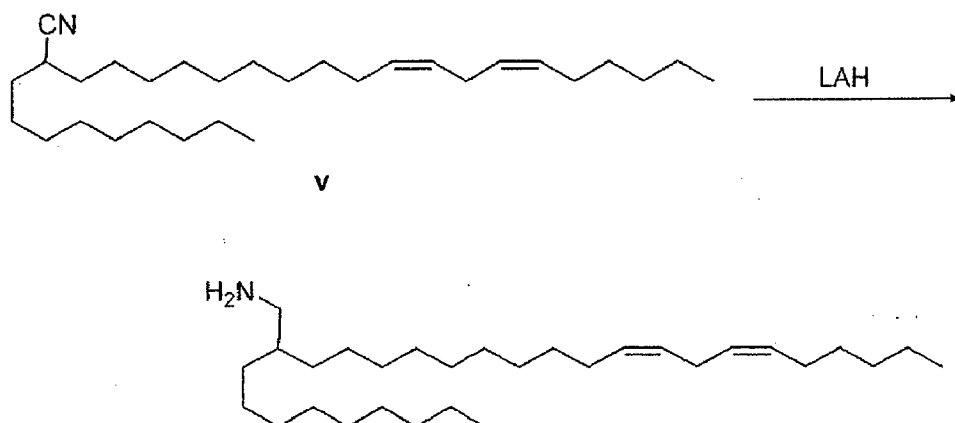
ES 2 987 915 T3

21		C32H64N calculado, 462,5033; encontrado 462,5023.
22		C33H64N calculado, 474,5033; encontrado 474,5033.
23		C29H60N calculado, 422,4720; encontrado 422,4716.
24		C29H60N calculado, 422,4720; encontrado 422,4718.
25		C31H64N calculado, 450,5033; encontrado 450,5031.
26		C31H64N calculado, 450,5033; encontrado 450,5034.
27		C35H72N calculado, 506,5659; encontrado 506,5635.
28		C31H64N calculado, 450,5033; encontrado 450,5037.
29		C33H68N calculado, 478,5346; encontrado 478,5358.
30		C27H56N calculado, 394,4407; encontrado 394,4407.

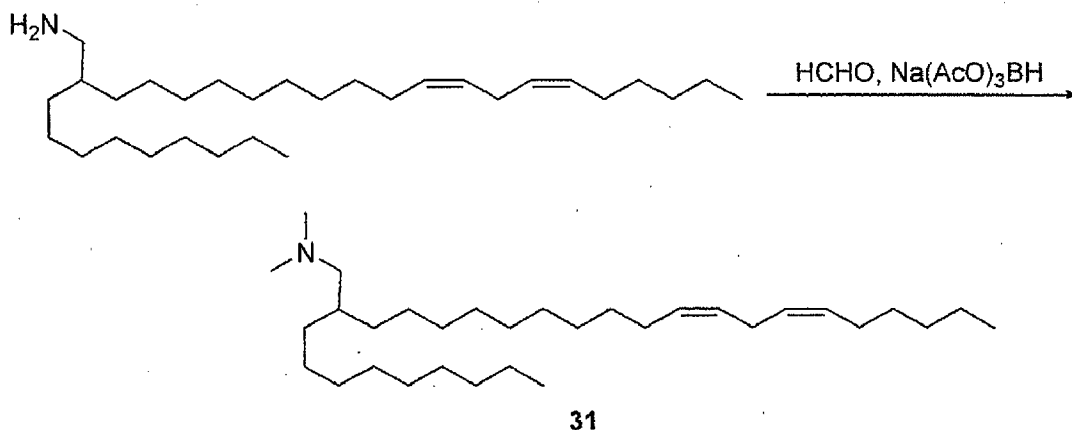
(12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicosa-12,15-dien-1-amina (compuesto 31)



- 5 Una disolución de la cetona iii (4,0 g, 9,55 mmol), TOSMIC (2,4 g, 12,4 mmol) en dimetoxietano (45 ml) se enfrió hasta 0 °C y se trató con terc-butóxido de potasio (19,1 mmol, 19,1 ml de una disolución 1 M en tBuOH). Después de 90 minutos, la reacción se repartió entre hexanos y agua. Los extractos orgánicos se lavaron con agua, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. Este material se purificó mediante cromatografía de resolución rápida (EtOAc al 0-5 %/hexanos) para dar el producto deseado (que contenía aproximadamente 20 % de s.m.). Esta mezcla se llevó a la siguiente etapa tal cual. CL/EM (M+H) = 430,6.

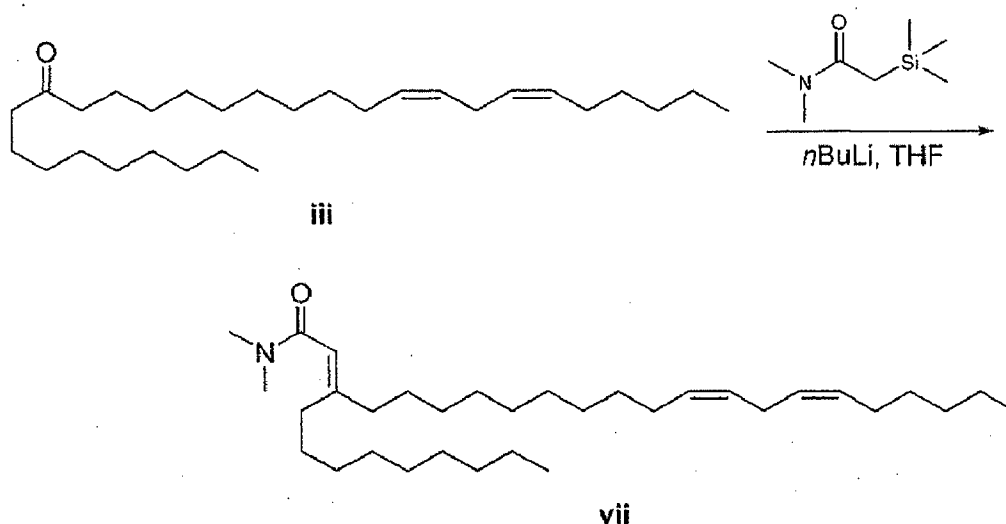


- 10 Se añadió hidruro de litio y aluminio (23,9 mmol, 23,9 ml de una disolución 1 M en THF) directamente al nitrilo v (3,42 g, 8 mmol) a temperatura ambiente y la reacción se agitó durante 20 minutos. La reacción se diluyó con 100 ml de THF, se enfrió hasta 0 °C y se inactivó cuidadosamente con una disolución de sulfato de sodio decahidratado. Los sólidos se separaron por filtración y se lavaron con THF. El filtrado se evaporó al vacío y se llevó directamente a la siguiente reacción en bruto. CL/EM (M+H) = 434,6.



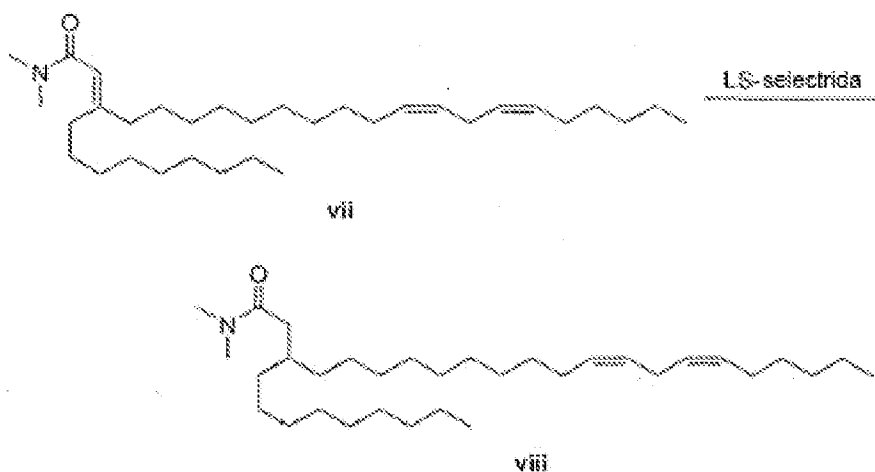
5 Se trató una disolución de amina primaria (3,45 g, 6,2 mmol) en dicloroetano (100 ml) se trató con formaldehído (1,6 ml, 21,7 mmol), seguido de triacetoxiborohidruro de sodio (6,6 g, 31 mmol). Después de 5 minutos, la reacción se repartió entre diclorometano y NaOH 1 N. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. La mezcla bruta se purificó mediante una cromatografía preparativa en fase inversa (columna C8) para proporcionar (12Z,15Z)-*N,N*-dimetil-2-nonilhenicoso-12,15-dien-1-amina. HRMS calculado, 462,5033; encontrado, 462,5026. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,35 (m, 4H), 2,78 (2H, t, $J = 5,6$ Hz), 2,18 (s, 6H), 2,05 (m, 6H), 1,3 (m, 39H), 0,89 (m, 6H).

(13Z,16Z)-*N,N*-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (compuesto 32)



10 El reactivo de Peterson de sililamida (3,1 g, 16,7 mmol) se disolvió en THF (35 ml) y se enfrió hasta -63 °C. A esta disolución se le añadió $n\text{BuLi}$ (16,7 mmol, 6,7 ml de una disolución 2,5 M). La reacción se calentó hasta la temperatura ambiente durante 30 minutos. La cetona (5,0 g, 11,9 mmol) se disolvió en THF (25 ml) en un segundo matraz. La disolución de cetona se transfirió al reactivo de Peterson durante 30 minutos mientras se mantenía la temperatura entre -60 °C y -40 °C. La reacción se calentó hasta -40 °C durante 1 hora, luego se calentó hasta 0 °C durante 30 minutos. La reacción se inactivó con bicarbonato de sodio, se diluyó con más agua y se repartió entre agua/hexanos. Los extractos orgánicos se lavaron con salmuera, se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. Una purificación por cromatografía de resolución rápida (MTBE al 0-40 %/hexanos) produjo la α,β -amida insaturada vii. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,75 (s, 1H), 5,36 (m, 4H), 3,01 (s, 3H), 2,99 (s, 3H), 2,78 (t, 2H), 2,28 (t, 2H), 2,05 (m, 6H), 1,35 (m, 34H), 0,89 (m, 6H).

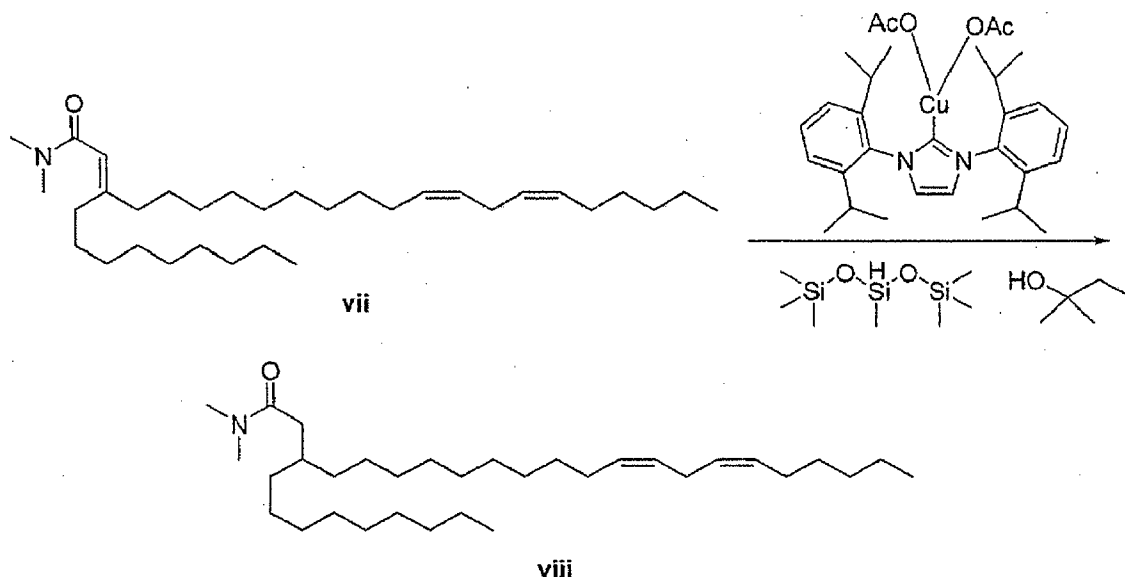
15



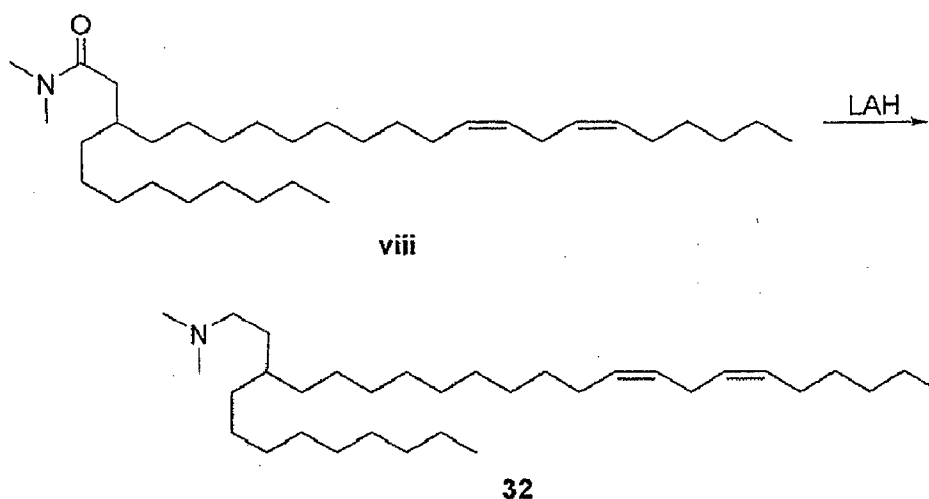
20 La amida α,β -insaturada vii (1 g, 2,1 mmol) y LS-selectrida (4,1 mmol, 4,1 ml de una disolución 1 M) se combinaron en un tubo sellado y se calentaron hasta 60 °C durante 24 horas. La reacción se enfrió hasta la temperatura ambiente y se repartió entre una disolución de cloruro de amonio y heptano. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato

de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío producir la amida viii. Este intermedio se llevó directamente a la siguiente reacción en bruto.

Una reducción conjugada alternativa de la α,β -amida insaturada vii implica el uso de una reducción de hidruro de cobre:

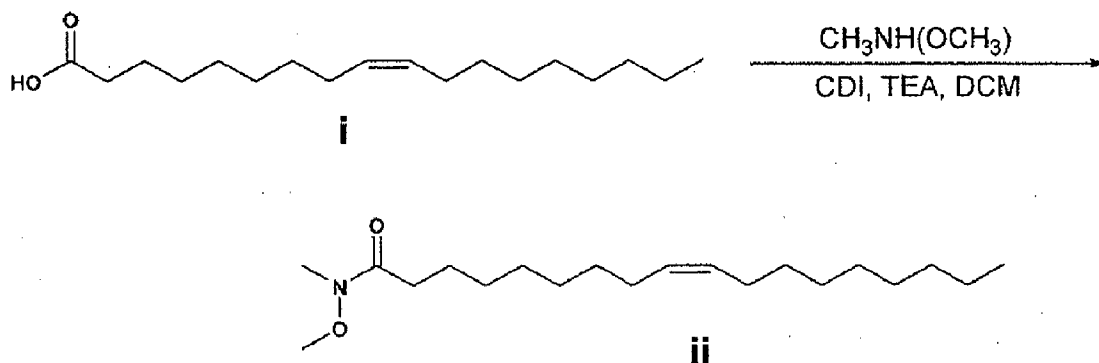


- 5 En un RB de 5 l, el catalizador de cobre (9,77 g, 17,13 mmol) se disolvió en tolueno (1713 ml) bajo nitrógeno. A esto se le añadió el PMHS, de Aldrich (304 ml, 1371 mmol) en una sola porción. La reacción se envejeció durante 5 minutos. A las disoluciones se les añadió la amida α,β -insaturada vii (167,16 g, 343 mmol). A continuación, se añadió a esta mezcla el alcohol *t*-amílico (113 ml, 1028 mmol) durante 3 h mediante una bomba de jeringa. Una vez completada la
- 10 adición, a la disolución se le añadieron aproximadamente 1700 ml de NH_4OH al 20 % hasta rxn en pequeñas porciones. *Precaución:* hay una vigorosa efervescencia y formación de espuma al comienzo de la extinción y debe controlarse de cerca y el hidróxido de amonio debe añadirse lentamente en pequeñas porciones. La reacción se repartió entre agua y hexanos. Los extractos orgánicos se filtraron a través de celite y se evaporaron al vacío. El material sólido gomoso resultante se pulverizó usando un agitador mecánico en hexanos para producir pequeñas partículas que luego se filtraron y lavaron con hexanos. A continuación, los extractos orgánicos se evaporaron al vacío
- 15 y se purificaron mediante cromatografía de resolución rápida (sílice, acetato de etilo al 0-15 %/hexanos) para dar la amida viii deseada. CL/EM (M+H) = 490,7.

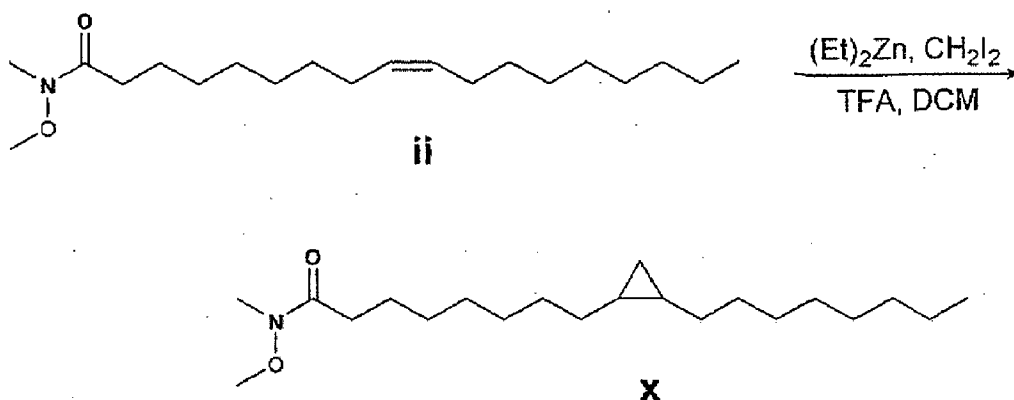


- A una disolución de amida viii (2,85g, 5,8 mmol) se añadió hidruro de litio y aluminio (8,7 mmol, 8,7 ml de una disolución 1 M). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 10 minutos y luego se extinguió mediante la adición lenta de una disolución de sulfato de sodio decahidratado. Los sólidos se filtraron y lavaron con THF y el filtrado se evaporó al vacío. La mezcla bruta se purificó mediante una cromatografía preparativa en fase inversa (columna C8) para proporcionar (13*Z*,16*Z*)-*N,N*-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (compuesto **32**) como un aceite. HRMS (M+H) calculado, 476,5190; encontrado, 476,5189. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,37 (m, 4H), 2,78 (t, 2H), 2,42 (m, 8H), 2,05 (q, 4H), 1,28 (m, 41H), 0,89 (m, 6H).
- 20

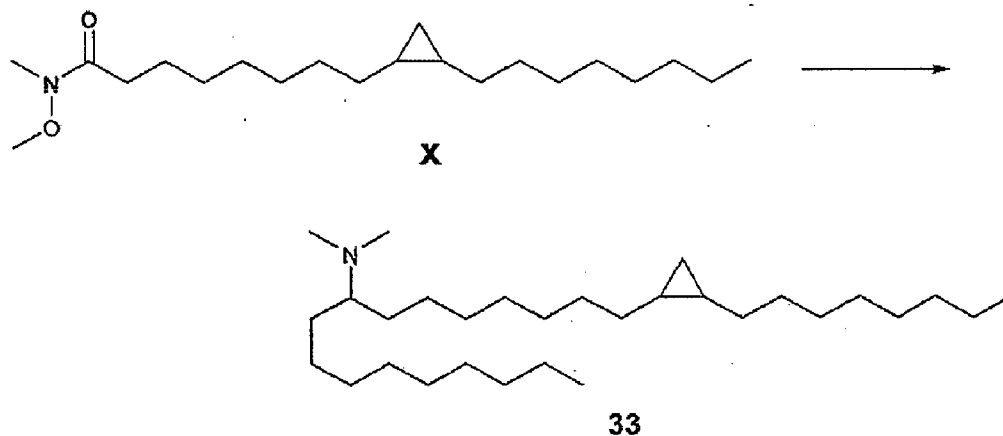
N,N-dimetil-1-(2-octilciclopropil)heptadecan-8-amina (compuesto 33)



5 A una disolución de ácido oleico (1 g, 3,5 mmol) en DCM (500 ml) enfriada hasta 0 °C se le añadió CDI (0,63 g, 3,9 mmol). La reacción se calentó hasta la temperatura ambiente durante 30 minutos antes de enfriar hasta 0 °C y se trató primero con trietilamina (0,39 g, 3,9 mmol) y luego con clorhidrato de dimetilhidroxilamina (0,38 g, 3,9 mmol). Después de 1 hora, la reacción se repartió entre agua y heptano. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de magnesio, se filtraron y se evaporaron al vacío para producir la amida de Weinreb bruta ii que se llevó directamente a la siguiente reacción.



10 Una disolución de dietilzinc (70,3 mmol, 70,3 ml de una disolución 1 M) en diclorometano (130 ml) se enfrió hasta -1 °C y se trató gota a gota con TFA (8,0 g, 70,3 mmol). Después de 30 minutos, se añadió diyodometano (18,8 g, 70,3 mmol) y se envejeció durante 30 minutos en el baño de hielo. A esta disolución se le añadió la amida de Weinreb ii (7,6 g, 23,4 mmol). La reacción se calentó hasta la temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La reacción se extinguió con una disolución de cloruro de amonio (100 ml) y la capa orgánica se repartió, se lavó con tiosulfato de sodio al 10 %
15 se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se evaporó al vacío. La purificación se realizó con una cromatografía de resolución rápida (MTBE al 0-30 %/heptano) para producir el producto deseado x. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 3,72 (s, 3H), 3,22 (s, 3H), 2,48 (t, 2H), 1,65 (m, 2H), 1,39 (m, 22H), 1,18 (m, 2H), 0,91 (t, 3H), 0,68 (m, 2H), 0,59 (m, 1H), -0,32 (m, 1H).



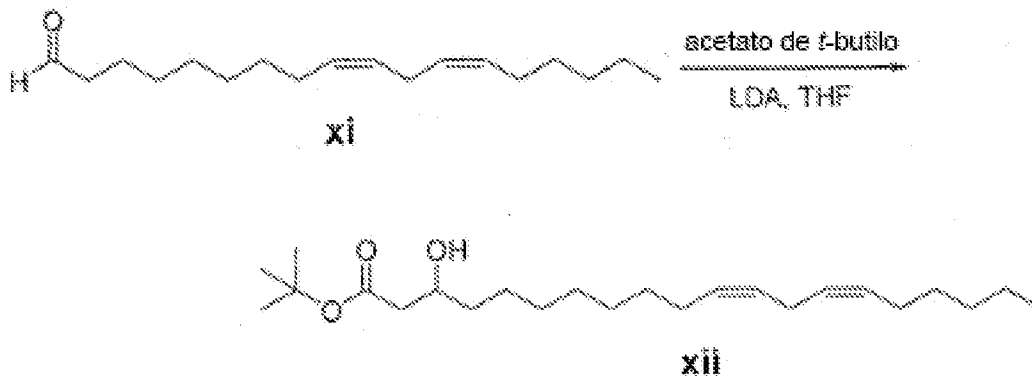
ES 2 987 915 T3

La conversión de la amida de Weinreb x en el compuesto 33 se llevó a cabo de una manera análoga a la descrita para el compuesto 1 anteriormente (adición de nonil Grignard seguida de aminación reductora). CL/EM (M+H) = 436,6. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 2,25 (s, 6H), 1,30 (m, 45H), 0,91 (m, 6H), 0,68 (m, 2H), 0,59 (m, 1H), -0,31 (m, 1H).

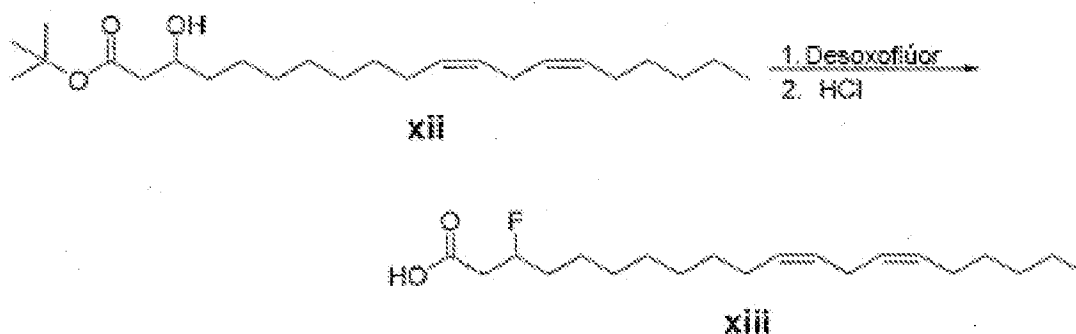
Los compuestos 34-43 son nuevos lípidos catiónicos y se prepararon según los esquemas generales 1-4 anteriores.

Compuesto	Estructura	HRMS
34		C30H62N calculado, 436,4877; encontrado, 436,4872.
35		C32H66N calculado, 464,5190; encontrado, 464,5186.
36		C34H70N calculado, 492,5503; encontrado, 492,5496.
37		C33H66N calculado, 476,5190; encontrado, 476,5174.
38		C29H60N calculado, 422,4720; encontrado, 422,4701.
39		C30H62N calculado, 436,4877; encontrado, 436,4880.
40		C32H66N calculado, 464,5190; encontrado, 464,5199.
41		G30H62N calculado, 436,4877; encontrado, 436,4877.
42		C30H62N calculado, 436,4877; encontrado, 436,4875.
43		CL/EM (M+H) 408,6.

(11*E*,20*Z*,23*Z*)-*N,N*-dimetilnonacosa-11,20,23-trien-10-amina (compuesto 44)

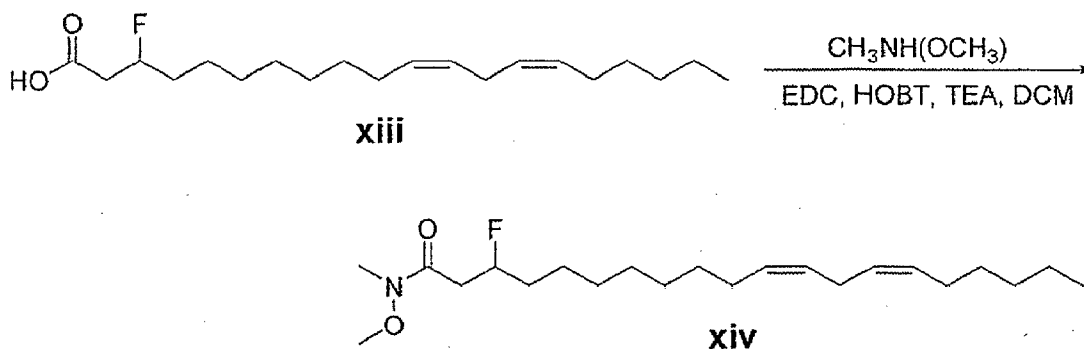


5 A una disolución de LDA (95 mmol, 47,5 ml de una disolución 2 M) en THF (127 ml) enfriada hasta $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ se le añadió acetato de *t*-butilo. La reacción se agitó durante 15 minutos, seguido de la adición del aldehído xi. La reacción se extinguió inmediatamente con una disolución de cloruro de amonio, se calentó hasta la temperatura ambiente y se repartió entre agua/pentano. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. CL/EM (M + H-*t*Bu) = 325,4.

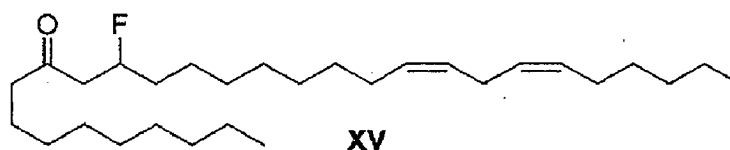
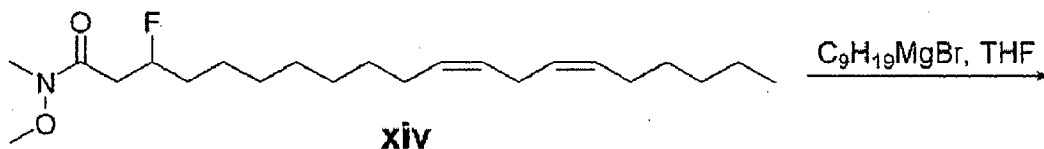


10 La hidroxiketona xii (7g, 18,4 mmol) se disolvió en diclorometano (150 ml) y se enfrió hasta $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se trató con desoxofluor (7,3 g, 33,1 mmol). La reacción se calentó hasta la temperatura ambiente con agitación durante 16 horas, seguido de la extinción con una disolución de bicarbonato de sodio. La reacción se repartió y los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. Una cromatografía de resolución rápida en columna (acetato de etilo al 0-5 %/hexanos) dio el β -fluoroéster.

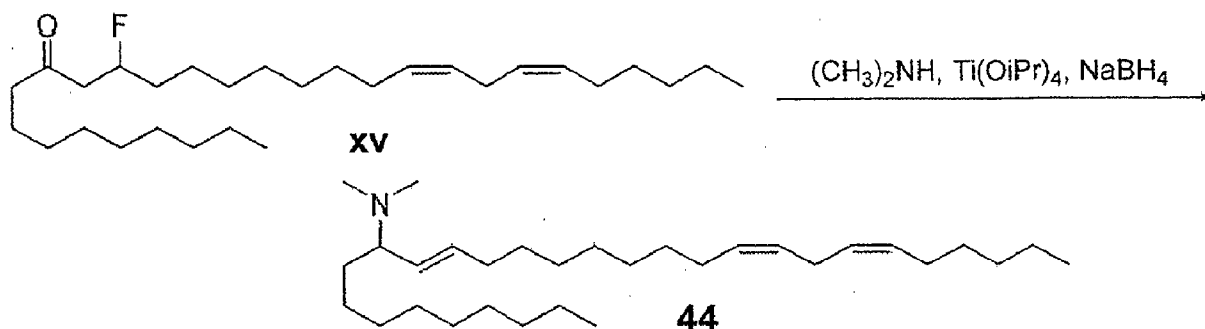
15 El intermedio de fluoroéster (6 g, 15,6 mmol) en diclorometano se trató con cloruro de hidrógeno (157 mmol, 39,2 ml de una disolución 4 M en dioxano) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se evaporó al vacío para dar el β -fluoroácido deseado xiii. CL/EM (M+H) = 327,3.



5 El ácido fluorocarboxílico xiii (5,1 g, 15,7 mmol), EDC (6,0 g, 31,4 mmol), clorhidrato de N,O-dimetilhidroxilamina (3,1 g, 31,4 mmol), trimetilamina (4,0 g, 39,2 mmol) y HOAt (4,3 g, 31,4 mmol) se combinaron en DCM (78 ml) y se agitaron a temperatura ambiente durante 16 horas. La reacción se repartió entre agua/DCM y los extractos orgánicos se lavaron con agua (3x) y una disolución de NaOH (1x), se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. El material bruto se purificó mediante una cromatografía preparativa en fase inversa para dar la amida de Weinreb deseada xiv. CL/EM (M+H) = 370,4.



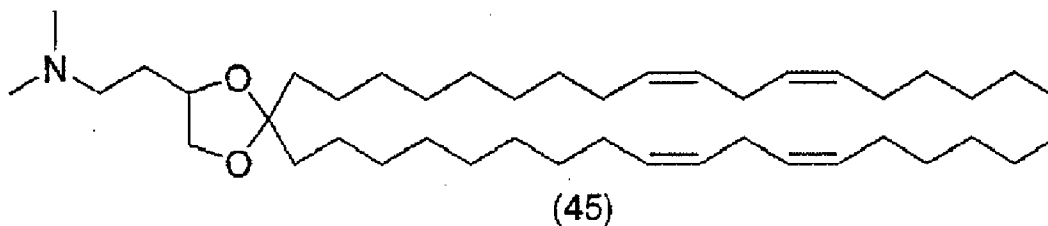
10 Una disolución de la amida de Weinreb xiv (4,3 g, 11,7 mmol) en THF (50 ml) se trató con bromuro de nonilmagnesio (23,4 mmol, 23,4 ml de una disolución 1 M) a temperatura ambiente. La reacción se extinguió con una disolución de cloruro de amonio después de 1 hora y se repartió entre agua y pentano. Los extractos orgánicos se secaron sobre sulfato de sodio, se filtraron y se evaporaron al vacío. Este material se llevó a la siguiente etapa en bruto.



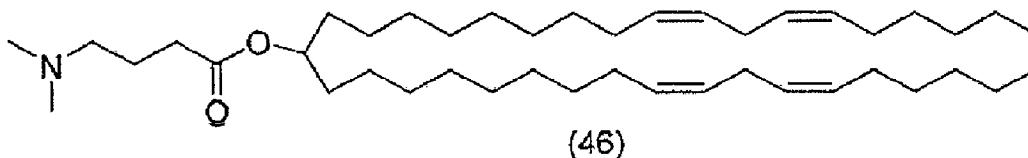
15 Se trató la cetona xv (5,1 g, 11,7 mmol) con dimetilamina (29,3 mmol, 14,7 ml de una disolución 2 M en THF) e isopropóxido de titanio(IV) (6,7 g, 23,5 mmol) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 horas. A la mezcla de reacción se le añadió etanol (50 ml), seguido de borohidruro de sodio (0,67 g, 17,6 mmol). La reacción se cargó directamente en una columna de sílice y se purificó mediante cromatografía de resolución rápida (MeOH al 0-15 %/DCM). El material requirió una segunda purificación mediante una cromatografía preparativa en fase inversa para dar (11E,20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacos-11,20,23-trien-10-amina. HRMS calculado, 446,4720; encontrado, 446,4724. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5,48 (m, 1H), 5,37 (m, 4H), 5,23 (m, 1H), 2,78 (t, 2H), 2,58 (m, 1H), 2,22 (s, 6H), 2,04 (m, 6H), 1,56 (m, 1H), 1,30 (m, 31H), 0,89 (m, 6H).

20

El compuesto 45 es DLinkC2DMA como se describe en Nature Biotechnology, 2010, 28, 172-176, documento WO 2010/042877 A1, documento WO 2010/048536 A2, documento WO 2010/088537 A2, y documento WO 2009/127060 A1.



El compuesto 46 es MC3 como se describe en el documento WO 2010/054401, y el documento WO 2010/144740 A1.



Composiciones de LNP

Las siguientes composiciones de nanopartículas lipídicas (LNP) son útiles para el suministro de oligonucleótidos, específicamente ARNip y miARN:

- 5 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 56,6/38/5,4;
 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 60/38/2;
 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 67,3/29/3,7;
 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 49,3/47/3,7;
 10 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 50,3/44,3/5,4;
 Lípido catiónico/colesterol/PEG-C-DMA/DSPC 40/48/2/10;
 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG/DSPC 40/48/2/10; y
 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG/DSPC 58/30/2/10.

Descripción del proceso de LNP:

- 15 Las nanopartículas lipídicas (LNP) se preparan mediante un proceso de chorro de impacto. Las partículas se forman mezclando lípidos disueltos en alcohol con ARNip disuelto en tampón citrato. La proporción de mezcla de lípidos a ARNip se establece en 45-55 % de lípidos y 65-45 % de ARNip. La disolución de lípidos contiene un lípido catiónico novedoso de la invención presente, un lípido auxiliar (colesterol), PEG-lípido (por ejemplo, PEG-C-DMA, PEG-DMG) y DSPC a una concentración de 5-15 mg/ml con una diana de 9-12 mg/mL en un alcohol (por ejemplo, etanol).
 20 La proporción de lípidos tiene un intervalo de porcentaje molar de 25-98 para el lípido catiónico con una diana de 35-65, el lípido auxiliar tiene un intervalo de porcentaje molar de 0-75 con una diana de 30-50, el lípido PEG tiene un intervalo de porcentaje molar de 1-15 con una diana de 1-6, y el DSPC tiene un intervalo de porcentaje molar de 0-15 con una diana de 0-12. La disolución de ARNip contiene una o más secuencias de ARNip en un intervalo de concentración de 0,3 a 1,0 mg/mL con una diana de 0,3-0,9 mg/mL en una disolución salina tamponada de sodio con un pH en el
 25 intervalo de 3,5-5. Los dos líquidos se calientan hasta una temperatura en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C, y luego se mezclan en un mezclador de chorro de impacto formándose instantáneamente las LNP. El teeID tiene un intervalo de 0,25 a 1,0 mm y un caudal total de 10-600 ml/min. La combinación de caudal y diámetro interior del conducto tiene el efecto de controlar el tamaño de partícula de las LNP entre 30 y 200 nm. A continuación, la disolución se mezcla con una disolución tamponada a un pH más alto con una proporción de mezcla en el intervalo
 30 de 1:1 a 1:3 vol:vol, pero con una diana de 1:2 vol:vol. Esta disolución tamponada se encuentra a una temperatura en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C. Las LNP mezcladas se mantienen de 30 minutos a 2 horas antes de una etapa de filtración de intercambio aniónico. La temperatura durante la incubación está en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C. Después de incubar, la disolución se filtra a través de un filtro de 0,8 µm que contiene una etapa de separación por intercambio aniónico. Este proceso utiliza unos diámetros internos del conducto que van desde 1 mm de DI hasta 5 mm de DI y un caudal de 10 a 2000 ml/min. Las LNP se concentran y se diafiltran mediante un proceso de ultrafiltración en el que se elimina el alcohol y se intercambia el tampón citrato por la disolución tampón final, tal como la disolución salina tamponada con fosfato. El proceso de ultrafiltración utiliza un formato de filtración de flujo tangencial ("tangential flow filtration", TFF). Este proceso utiliza un intervalo de corte de peso molecular nominal de la membrana de 30-500 KD. El formato de la membrana puede ser de un módulo de fibra hueca o de lámina plana.
 40 Los procesos de TFF con el corte de peso molecular adecuado retienen las LNP en el retenido y el filtrado o permeado contiene el alcohol; tampón de citrato; residuos de tampón final. El proceso de TFF es un proceso de varias etapas con una concentración inicial a una concentración de ARNip de 1-3 mg/mL. Después de la concentración, la disolución de LNP se diafiltra contra el tampón final para 10-20 volúmenes para eliminar el alcohol y realizar el intercambio de tampón. A continuación, el material se concentra de 1-3 veces más. Las etapas finales del proceso de LNP son esterilizar por filtración la disolución concentrada de LNP y colocar el producto en viales.

Procedimiento analítico:

- 1) Concentración de ARNip

Las concentraciones de dúplex de ARNip se determinan mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) utilizando el sistema Waters 2695 Alliance (Water Corporation, Milford MA) con un detector 2996 PDA. Las LNP, también denominadas vehículos de suministro de ARNi ("RNAi Delivery Vehicles", RDV), se tratan con Triton X-100 al 0,5 % para obtener ARNip total libre y se analizan mediante separación SAX utilizando una columna Dionex BioLC DNAPac PA 200 (4 × 250 mm) con detección UV en 254 nm. La fase móvil se compone de A: NaClO₄ 25 mM, Tris 10 mM, EtOH al 20 %, pH 7,0 y B: NaClO₄ 250 mM, Tris 10 mM, EtOH al 20 %, pH 7,0 con un gradiente lineal de 0 a 15 min y un caudal de 1 ml/min. La cantidad de ARNip se determina comparando con la curva patrón de ARNip.

2) Tasa de encapsulación

Se emplea el reactivo de fluorescencia SYBR Gold para la cuantificación de ARN para controlar la tasa de encapsulación de RDV. Los RDV con o sin Triton X-100 se utilizan para determinar el ARNip libre y la cantidad de ARNip total. El ensayo se realiza utilizando un espectrofotómetro de microplacas SpectraMax M5e de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Las muestras se excitan a 485 nm y se mide la emisión de fluorescencia a 530 nm. La cantidad de ARNip se determina comparando con la curva patrón de ARNip.

Tasa de encapsulación = $(1 - \text{ARNip libre} / \text{ARNip total}) \times 100 \%$

3) Tamaño de partícula y polidispersión

Los RDV que contienen 1 µg de ARNip se diluyen hasta un volumen final de 3 ml con 1 × PBS. El tamaño de partícula y la polidispersión de las muestras se miden mediante un método de dispersión de luz dinámica utilizando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY). La intensidad de dispersión se mide con láser He-Ne a 25 °C con un ángulo de dispersión de 90°.

4) Análisis de potencial zeta

Los RDV que contienen 1 µg de ARNip se diluyen hasta un volumen final de 2 ml con tampón Tris 1 mM (pH 7,4). La movilidad electroforética de las muestras se determina utilizando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) con un electrodo y un láser He-Ne como fuente de luz. El límite de Smoluchowski se asume en el cálculo de los potenciales zeta.

5) Análisis de lípidos

Las concentraciones de lípidos individuales se determinan mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) utilizando el sistema Waters 2695 Alliance (Water Corporation, Milford MA) con un detector de aerosol cargado Corona (CAD) (ESA Biosciences, Inc, Chelmsford, MA). Los lípidos individuales en los RDV se analizan usando una columna Agilent Zorbax SB-C18 (50 × 4,6 mm, tamaño de partícula de 1,8 µm) con CAD a 60 °C. La fase móvil se compone de A: TFA al 0,1 % en H₂O y B: TFA al 0,1 % en IPA. El gradiente cambia desde el 60 % de la fase móvil A y el 40 % de la fase móvil B desde el momento 0, hasta el 40 % de la fase móvil A y el 60 % de la fase móvil B a 1,00 min; 40 % de la fase móvil A y 60 % de la fase móvil B de 1,00 a 5,00 min; 40 % de la fase móvil A y 60 % de la fase móvil B desde 5,00 min hasta 25 % de la fase móvil A y 75 % de la fase móvil B a 10,00 min; 25 % de la fase móvil A y 75 % de la fase móvil B desde 10,00 min hasta 5 % de la fase móvil A y 95 % de la fase móvil B a 15,00 min; y 5 % de la fase móvil A y 95 % de la fase móvil B de 15,00 a 60 % de la fase móvil A y 40 % de la fase móvil B a 20,00 min con un caudal de 1 ml/min. La concentración de lípidos individuales se determina comparando con la curva patrón con todos los componentes lipídicos en los RDV con un ajuste de curva cuadrático. El porcentaje molar de cada lípido se calcula en función de su peso molecular.

Descripción del proceso de LNP general para formulaciones del compuesto 32:

Las nanopartículas de lípidos se prepararon mediante un proceso de chorro de impacto. Las partículas se formaron mezclando lípidos disueltos en alcohol con ARNip disuelto en tampón citrato. La disolución de lípidos contenía un lípido catiónico, un lípido auxiliar (colesterol), PEG-lípido (por ejemplo, PEG-C-DMA, PEG-DMG) y DSPC a una concentración de 5-15 mg/ml con una diana de 9-12 mg/mL en un alcohol (por ejemplo, etanol). La proporción de lípidos tenía un intervalo de porcentaje molar de 25-98 para el lípido catiónico con una diana de 35-65, el lípido auxiliar tenía un intervalo de porcentaje molar de 0-75 con una diana de 30-50, el lípido PEG tenía un intervalo de porcentaje molar de 1-15 con una diana de 1-6, y el DSPC tenía un intervalo de porcentaje molar de 0-15 con una diana de 0-12. La disolución de ARNip contenía una o más secuencias de ARNip en un intervalo de concentración de 0,3 a 0,6 mg/ml con una diana de 0,3-0,9 mg/ml en una disolución salina tamponada con citrato de sodio con un pH en el intervalo de 3,5-5. Las dos disoluciones se calentaron hasta una temperatura en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C, y luego se mezclaron en un mezclador de chorro de impacto formando instantáneamente las LNP. El teeID tenía un intervalo de 0,25 a 1,0 mm y un caudal total de 10-600 ml/minuto. La combinación de caudal y diámetro interior del conducto tuvo el efecto de controlar el tamaño de partícula de las LNP entre 30 y 200 nm. La suspensión de LNP se mezcló luego con una disolución tamponada a un pH más alto con una proporción de mezcla en el intervalo de 1:1 a 1:3 vol:vol, pero con una diana de 1:2 vol:vol. Esta disolución tamponada estaba a una temperatura en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C. Esta suspensión de LNP se mezcló adicionalmente con una disolución tamponada a un pH más alto y con una proporción de mezcla en el intervalo de 1:1 a 1:3 vol:vol, pero con una diana

de 1:2 vol:vol. La disolución tamponada estaba a una temperatura en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C. Las LNP mezcladas se mantuvieron de 30 minutos a 2 horas antes de una etapa de filtración de intercambio aniónico. La temperatura durante la incubación estuvo en el intervalo de 15-40 °C, con una diana de 30-40 °C. Después de incubar, la suspensión de LNP se filtró a través de un filtro de 0,8 µm que contenía una etapa de separación por intercambio aniónico. Este proceso utilizó unos diámetros internos de los conductos que iban desde 1 mm de diámetro interno hasta 5 mm de diámetro interno y un caudal de 10 a 2000 ml/minuto. Las LNP se concentraron y se diafiltraron mediante un proceso de ultrafiltración en el que se eliminó el alcohol y el tampón citrato se cambió por la disolución de tampón final, tal como disolución salina tamponada con fosfato. El proceso de ultrafiltración utilizó un formato de filtración de flujo tangencial (TFF). Este proceso utilizó un intervalo de corte de peso molecular nominal de la membrana de 30-500 KD. El formato de la membrana era un módulo de fibra hueca o de lámina plana. Los procesos de TFF con el corte de peso molecular adecuado retuvieron a las LNP en el retenido y el filtrado o permeado contenía el alcohol; tampón citrato; y residuos de tampón final. El proceso de TFF es un proceso de varias etapas con una concentración inicial a una concentración de ARNip de 1-3 mg/mL. Después de la concentración, la suspensión de LNP se diafiltró contra el tampón final para 10-20 volúmenes para eliminar el alcohol y realizar el intercambio de tampón. A continuación, el material se concentró 1-3 veces más. Las etapas finales del proceso de LNP fueron esterilizar mediante filtración la disolución concentrada de LNP y colocar el producto en viales.

Procedimiento analítico:

Concentración de ARNip

Las concentraciones de dúplex de ARNip se determinaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) usando el sistema Waters 2695 Alliance (Water Corporation, Milford MA) con un detector 2996 PDA. Las LNP, también denominadas vehículos de administración de ARNi (RDV), se trataron con Triton X-100 al 0,5 % para obtener ARNip total libre y se analizaron mediante separación SAX utilizando una columna Dionex BioLC DNAPac PA 200 (4 × 250 mm) con detección UV a 254 nm. La fase móvil estaba compuesta por A: NaClO₄ 25 mM, Tris 10 mM, EtOH al 20 %, pH 7,0 y B: NaClO₄ 250 mM, Tris 10 mM, EtOH al 20 %, pH 7,0 con un gradiente lineal de 0 a 15 min y un caudal de 1 ml/minuto. La cantidad de ARNip se determinó comparándola con la curva patrón de ARNip.

Tasa de encapsulación

Se empleó el reactivo de fluorescencia SYBR Gold para la cuantificación del ARN para controlar la tasa de encapsulación de los RDV. Se utilizaron RDV con o sin Triton X-100 para determinar el ARNip libre y la cantidad total de ARNip. El ensayo se realiza utilizando un espectrofotómetro de microplacas SpectraMax M5e de Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Las muestras se excitaron a 485 nm y se midió la emisión de fluorescencia a 530 nm. La cantidad de ARNip se determina comparando con una curva patrón de ANip.

$$\text{Tasa de encapsulación} = (1 - \text{ANip libre/ANip total}) \times 100 \%$$

Tamaño de partícula y polidispersión

Los RDV que contenían 1 µg de ARNip se diluyeron hasta un volumen final de 3 ml con 1 x PBS. El tamaño de partícula y la polidispersión de las muestras se midieron mediante un método de dispersión de luz dinámica usando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY). La intensidad de dispersión se midió con un láser He-Ne a 25 °C con un ángulo de dispersión de 90°.

Análisis de potencial zeta

Los RDV que contenían 1 µg de ARNip se diluyeron hasta un volumen final de 2 ml con tampón Tris 1 mM (pH 7,4). La movilidad electroforética de las muestras se determinó utilizando un instrumento ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY) con un electrodo y un láser He-Ne como fuente de luz. El límite de Smoluchowski se asumió en el cálculo de los potenciales zeta.

Análisis de lípidos

Las concentraciones de lípidos individuales se determinaron mediante una cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) utilizando el sistema Waters 2695 Alliance (Water Corporation, Milford MA) con un detector de aerosol cargado Corona (CAD) (ESA Biosciences, Inc, Chelmsford, MA). Los lípidos individuales en los RDV se analizaron usando una columna Agilent Zorbax SB-C18 (50 x 4,6 mm, tamaño de partícula de 1,8 µm) con CAD a 60 °C. La fase móvil estaba compuesta por A: TFA al 0,1 % en H₂O y B: TFA al 0,1 % en IPA. El gradiente cambió desde el 60 % de la fase móvil A y el 40 % de la fase móvil B desde el momento 0 hasta el 40 % de la fase móvil A y el 60 % de la fase móvil B a 1,00 min; 40 % de la fase móvil A y 60 % de la fase móvil B de 1,00 a 5,00 min; 40 % de la fase móvil A y 60 % de la fase móvil B desde 5,00 min hasta 25 % de la fase móvil A y 75 % de la fase móvil B a 10,00 min; 25 % de la fase móvil A y 75 % de la fase móvil B desde 10,00 min hasta 5 % de la fase móvil A y 95 % de la fase móvil B a 15,00 min; y 5 % de la fase móvil A y 95 % de la fase móvil B de 15,00 a 60 % de la fase móvil A y 40 % de la fase móvil B a 20,00 min con un caudal de 1 ml/minuto. La concentración de lípidos individuales se determinó comparando con la curva patrón con todos los componentes lipídicos en los RDV con un ajuste de curva cuadrático.

El porcentaje molar de cada lípido se calculó en base a su peso molecular.

Preparación general de LNP para diversas formulaciones en la tabla 1

5 Las suspensiones de nanopartículas de ARNip de la tabla 1 se preparan disolviendo ARNip y/o moléculas portadoras en tampón de citrato de sodio 20 mM (pH 5,0) a una concentración de aproximadamente 0,40 mg/ml. Las disoluciones de lípidos se preparan disolviendo una mezcla de lípidos catiónicos (por ejemplo, 32, consulte la estructura en la tabla 2), DSPC, colesterol y PEG-DMG (las proporciones se muestran en la tabla 1) en etanol absoluto a una concentración de aproximadamente 8 mg/ml. La proporción de nitrógeno a fosfato es de aproximadamente 6:1.

10 Se suministran volúmenes casi iguales de disoluciones de ARNip/portador y de lípidos con dos bombas FPLC a los mismos caudales a un conector en T de mezclado. Se utiliza una válvula de contrapresión para ajustar el tamaño de partícula deseado. La mezcla lechosa resultante se recoge en una botella de vidrio estéril. A continuación, esta mezcla se diluye con un volumen igual de tampón citrato, seguido de un volumen igual de PBS (pH 7,4) y se filtra a través de una membrana de intercambio iónico para eliminar cualquier ARNip/portador libre en la mezcla. Se emplea una ultrafiltración frente a PBS (7.4)) para eliminar el etanol y cambiar el tampón. La LNP final se obtiene concentrando hasta un volumen deseado y esterilizando por filtración a través de un filtro de 0,2 µm. Las LNP obtenidas se caracterizan en términos de tamaño de partícula, potencial zeta, contenido de alcohol, contenido de lípidos totales, ácido nucleico encapsulado y concentración de ácido nucleico total.

Proceso de fabricación de LNP

20 En un ejemplo no limitante, la LNP se prepara a granel como sigue. El proceso consiste en (1) preparar una disolución de lípidos; (2) preparar una disolución de ARNip/vehículo; (3) mezclado/formación de partículas; (4) incubación; (5) dilución; (6) ultrafiltración y concentración.

Preparación de disolución lipídica

25 Se despirogenan botellas de vidrio para reactivos de 2 L y cilindros de medición. Los lípidos se calientan hasta la temperatura ambiente. A la botella de vidrio para reactivos se transfieren 8,0 g del compuesto 32 con una pipeta y se añaden 1,2 g de DSPC, 3,5 g de colesterol, 0,9 g de PEG-DMG. A la mezcla se le añade 1 l de etanol. La botella de reactivo se coloca en un baño de agua caliente, a una temperatura que no exceda de 50 °C. La suspensión de lípidos se agita con una barra de agitación. Se coloca una sonda de termopar en la suspensión a través de un cuello del matraz de fondo redondo con un adaptador sellado. La suspensión se calienta a 30-40 °C hasta que se hace transparente. Se deja enfriar la disolución hasta la temperatura ambiente.

Preparación de la disolución de ARNip/portador

30 En un recipiente estéril, como la botella de almacenamiento Coming, se pesan 0,4 g veces el factor de corrección de agua (aproximadamente 1,2) del polvo de ARNip-1. El ARNip se transfiere a una botella de vidrio para reactivos despirogenada de 2 L. El recipiente de pesaje se enjuaga 3 veces con tampón citrato (20 mM, pH 5,0) y los enjuagues se colocan en la botella de vidrio de 2 L, QS con tampón citrato hasta 1 L. La concentración de la disolución de ARNip se determina con un espectrómetro de UV usando el siguiente procedimiento. Se retiran 20 µl de la disolución, se diluyen 50 veces hasta 1000 µl y se registra la lectura de UV a A260 nm después de blanquear con tampón citrato. Esto se repite. Si las lecturas de las dos muestras son coherentes, se toma un promedio y la concentración se calcula en base a los coeficientes de extinción de los ARNip. Si la concentración final está fuera del intervalo de $0,40 \pm 0,01$ mg/mL, la concentración se ajusta agregando más polvo de ARNip/portador, o agregando más tampón de citrato. Este proceso se repite para el segundo ARNip, si corresponde.

40 Como alternativa, si la disolución de ARNip/portador comprendía un solo dúplex de ARNip y/o portador en lugar de un cóctel de dos o más dúplex de ARNip y/o portadores, entonces el ARNip/portador se disuelve en tampón citrato 20 mM (pH 5,0) para obtener una concentración final de 0,4 mg/ml.

45 A continuación, las disoluciones de lípidos y etanol se esterilizan por filtración a través de un filtro estéril Pall Acropak 20 de 0,8/0,2 µm PN 12203 hacia un recipiente de vidrio despirogenado utilizando una bomba peristáltica Master Flex modelo 7520-40 para proporcionar un material de partida estéril para el proceso de encapsulación. El proceso de filtración se realiza a una escala de 80 mL con un área de membrana de 20 cm². El caudal es de 280 ml/minuto. Este proceso se puede escalar aumentando el diámetro del conducto y el área de filtración.

Formación de partículas - etapa de mezcla

50 Con una bomba de dos cilindros impulsada por jeringa (Harvard 33 Twin Syringe), la disolución estéril de lípidos/etanol y las disoluciones estériles de ARNip/portador o cóctel de ARNip/portador/tampón de citrato (tampón de citrato 20 mM, pH 5,0) se mezclan en un mezclador T de 0,5 mm de DI (etapa de mezclado I) a caudales iguales o casi iguales. La suspensión de LNP de salida resultante contenía etanol al 40-50 % en volumen. Cuando se desea una suspensión de salida de etanol al 45 % en volumen, las disoluciones estériles de lípido/etanol y de ARNip/portador o cóctel de ARNip/portador/citrato se mezclan a unos caudales de 54 mL/min y 66 mL/min, respectivamente, de forma que el caudal total de la salida de la mezcla es de 120 mL/min.

Dilución

5 La corriente de salida de la etapa de mezclado I se introduce directamente en a un mezclador T de 4 mm de diámetro interno (etapa de mezclado II), donde se diluye con una disolución tamponada a un pH más alto (citrato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 300 mM, pH 6,0) a una proporción de 1:1 vol:vol %. Esta disolución tamponada está a una temperatura en el intervalo de 30-40 °C y se introduce en el mezclador T de 4 mm a través de una bomba peristáltica (Cole Parmer MasterFlex L/S 600 RPM) a un caudal de 120 ml/min.

10 La corriente de salida de la etapa de mezclado II se introduce directamente en un mezclador T de 6 mm de diámetro interno (etapa de mezclado III), donde se diluye con una disolución tamponada a un pH más alto (PBS, pH 7,4) a una proporción de 1:1 vol:vol. %. Esta disolución tamponada está a una temperatura en el intervalo de 15-25 °C y se introduce en el mezclador T de 6 mm a través de una bomba peristáltica (Cole Parmer MasterFlex L/S 600 RPM) a un caudal de 240 ml/min.

Incubación y eliminación de ARNip libre

15 La corriente de salida de la etapa de mezclado III se mantiene después de mezclar durante 30 minutos de incubación. La incubación se realiza a una temperatura de 35-40 °C y la suspensión en proceso se protege de la luz. Después de la incubación, el ARNip libre (no encapsulado) se elimina mediante intercambio aniónico con filtros de cromatografía Mustang Q (cápsulas). Antes de su uso, los filtros de cromatografía se pretratan secuencialmente con enjuagados de NaOH 1 N, NaCl 1 M y una disolución final de etanol al 12,5 % en volumen en PBS. El pH del enjuagado final se verifica para asegurar un pH <8. A continuación, la corriente de LNP incubada se filtra mediante filtros Mustang Q a través de una bomba peristáltica (Cole Parmer MasterFlex L/S 600 RPM) a un caudal de aproximadamente 100 ml/min.

20 La corriente filtrada se recibe en un recipiente de vidrio estéril para la ultrafiltración y la concentración como sigue.

Ultrafiltración, concentración y filtración estéril

El proceso de ultrafiltración es un proceso cronometrado y los caudales deben controlarse cuidadosamente. Este es un proceso de dos etapas; la primera es una etapa de concentración que toma el material diluido y lo concentra en aproximadamente 8 veces, hasta una concentración de aproximadamente 0,3-0,6 mg/ml de ARNip.

25 En la primera etapa, un soporte de anillo con una membrana de ultrafiltración de 100 kDa PES (Spectrum Labs) instalada se conecta a una bomba peristáltica (Spectrum KrosFloII System). Se añaden 9,2 L de agua destilada estéril al depósito; se drenan 3 L para su eliminación y el resto se drena a través del permeado para su eliminación. Se añaden 5,3 L de hidróxido de sodio 0,25 N al depósito, drenándose 1,5 L drenados para su eliminación y drenándose 3,1 L a través del permeado para su eliminación. El hidróxido de sodio restante se mantiene en el sistema para la desinfección (al menos 10 minutos) y luego se drena la bomba. Se añaden 9,2 L de alcohol isopropílico al 70 % (en v/v) al depósito, drenándose 1,5 L para su eliminación y drenándose el resto a través del permeado para su eliminación.

30 Se añaden 6 L de tampón acondicionador (etanol al 12,5 % en disolución salina tamponada con fosfato), se drenan 1,5 L para su eliminación y el resto se drena a través del permeado hasta que el desecho tenga un pH neutro (7-8). Se registra un valor de flujo de membrana y luego se drena la bomba.

35 La disolución de LNP diluida se coloca en el depósito hasta la marca de 1,1 L. La bomba se enciende a 2,3 L/min. Después de 5 minutos de recirculación, la bomba de permeado se enciende a 62,5 ml/min y el nivel de líquido se mantiene constante a aproximadamente 950 ml en el depósito. La disolución de LNP diluida se concentra de 9,8 L a 1,1 L en 140 minutos y la bomba se detiene cuando toda la disolución de LNP diluida se ha transferido al depósito.

40 La segunda etapa es una etapa de diafiltración que intercambia el tampón etanol/acuoso por disolución salina tamponada con fosfato. Durante esta etapa, se utilizan aproximadamente 10-20 volúmenes de diafiltración de disolución salina tamponada con fosfato. Después de la diafiltración, se lleva a cabo una segunda concentración para concentrar la suspensión de LNP en 3 veces hasta aproximadamente 1-1,5 mg/ml de ARNip. La suspensión concentrada se recoge en botellas de plástico PETG estériles. A continuación, la suspensión final se filtra secuencialmente mediante filtros Pall de 0,45 µm de PES y Pall de 0,2 µm de PES para la esterilización terminal antes del llenado del vial.

45

En una realización, una composición de LNP descrita en el presente documento comprende un lípido catiónico de fórmula A, colesterol, DSPC y PEG-DMG.

En otra realización, una composición de LNP descrita en el presente documento comprende además un crioprotector.

50 En otra realización, el crioprotector es sacarosa, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, verbascosa, manitol, glucosa, lactosa, maltosa, maltotriosa-heptaosa, dextrano, hidroxietil-almidón, insulina, sorbitol, glicerol, arginina, histidina, lisina, prolina, dimetilsulfóxido o una combinación de los mismos. .

En otra realización, el crioprotector es sacarosa.

En otra realización, el crioprotector es trehalosa.

En otra realización, el crioprotector es una combinación de sacarosa y trehalosa.

En otra realización, la composición de LNP comprende el lípido catiónico (13Z,16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (compuesto 32), colesterol, DSPC y PEG-DMG.

Las LNP obtenidas se caracterizan en términos de tamaño de partícula, potencial zeta, contenido de alcohol, contenido de lípidos totales, ácido nucleico encapsulado y concentración de ácido nucleico total.

- 5 Un experto en la materia apreciará fácilmente que la presente invención está bien adaptada para llevar a cabo los objetos y obtener los fines y ventajas mencionados, así como los inherentes a la misma.

Tabla 1: Composición de formulaciones seleccionadas de nanopartículas lipídicas

Identificador de LNP	Componentes lipídicos y proporciones molares				ARNip	N/P
	32 (58 %)	Colesterol (30 %)	DSPC (10 %)	PEG-DMG (2 %)	SEQ ID 5 /6	6
	32 (58 %)	Colesterol (30 %)	DSPC (10 %)	PEG-DMG (2 %)	SEQ ID 7 /8	6
	32 (58 %)	Colesterol (30 %)	DSPC (10 %)	PEG-DMG (2 %)	SEQ ID 9 /10	6

Tabla 2: Estructuras químicas de los lípidos en las formulaciones de la tabla 1.

Lípido	Estructura química
32	
Colesterol	
DSPC	
PEG-DMG	

10

Utilizando el proceso de LNP descrito anteriormente, se identificaron LNP específicas con las siguientes proporciones:

Composición nominal:

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 60/38/2

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG/DSPC 58/30/2/10

15 ARNip de luc

5'-iB-AUAAGGCUAUGAAGAGAUATT-iB 3' (SEQ.ID.NO.:1)

ES 2 987 915 T3

3'-UUUUUCCGAUACUUCUAU-5' (SEQ.ID.NO :2)

AUGC – Ribosa

iB - desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

5

AGT - 2' Desoxi

AGU - 2'OCH₃

Composición nominal

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG 60/38/2

Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG/DSPC 40/48/2/10

10 Lípido catiónico/colesterol/PEG-DMG/DSPC 58/30/2/10

ApoB ARNip

5'-iB-CUUUAACAAUCCUGAAAUTsT- iB-3' (SEC ID No: 3)

3'-UsUGAAAUUGUUAAGGACUUsUsA-5' (SEC ID No 4)

AUGC - Ribosa

15

iB - desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

AGT - 2' Desoxi

AGU - 2'OCH₃

UsA - enlace fosforotioato

20 ARNip de beta-catenina

5'-iB-CUGUUGGAUUGAUUCGAAUsU-iB-3' (SEC ID No: 5)

3'-UsUGACAACCUAACUAAGCUUU-5' (SEC ID No 6)

AUGC - Ribosa

25

iB - desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

AGT - 2' Desoxi

AGU - 2'OCH₃

UsA - enlace fosforotioato

5'-iB-ACGACUAGUUCAGUUGCUUUsU-iB-3' (SEQ ID NO: 7)

30

3'-UsUUGCUGAUCAAGUCAACGAA-5' (SEC ID No 8)

AUGC - Ribosa

iB - desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

AGT - 2' Desoxi

35

AGU - 2'OCH₃

UsA - enlace fosforotioato

5'-iB-ACGACUAGUUCAGUUGCUUUsU-iB-3' (SEC ID No 9)

3'-UUUGCUGAUCAAGUCAACGAA-5' (SEC ID No 10)

AUGC - Ribosa

iB - desoxi abásico invertido

UC - 2' Fluoro

5 AGT - 2' Desoxi

AGU - 2'OCH₃

UsA - enlace fosforotioato

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

Ejemplo 1

Evaluación de la eficacia en ratón *in vivo*

15 Las LNP que utilizan los compuestos 1-44, en las composiciones nominales descritas inmediatamente arriba, se evaluaron para la eficacia *in vivo*. El ARNip se dirige a la transcripción de ARNm para el gen de luciferasa de luciérnaga (*Photinus pyralis*) (número de registro M15077). La secuencia primaria y el patrón de modificación química del ARNip de luciferasa se muestran anteriormente. El modelo de luciferasa *in vivo* emplea un ratón transgénico en el que la secuencia codificante de luciferasa de luciérnaga está presente en todas las células. Se induce a ratones transgénicos ROSA26-LoxP-Stop-LoxP-Luc (LSL-Luc) con licencia del Dana Farber Cancer Institute para que expresen el gen de la luciferasa eliminando primero la secuencia LSL con un virus Ad-Cre recombinante (Vector Biolabs). Debido a la naturaleza organotrópica del virus, la expresión se limita al hígado cuando se administra mediante inyección en la vena de la cola. Los niveles de expresión de luciferasa en el hígado se cuantifican midiendo la producción de luz, usando un generador de imágenes IVIS (Xenogen) después de la administración del sustrato de luciferina (Caliper Life Sciences). Los niveles de luminiscencia antes de la dosis se miden antes de la administración de los RDV. Se inyecta luciferina en PBS (15 mg/ml) por vía intraperitoneal (IP) en un volumen de 150 µl. Después de un período de incubación de cuatro minutos, los ratones se anestesian con isoflurano y se colocan en el generador de imágenes IVIS. Los RDV (que contienen ARNip) en el vehículo de PBS se inyectaron en la vena de la cola en un volumen de 0,2 ml. Los niveles de dosis finales oscilaron entre 0,1 y 0,5 mg/kg de ARNip. Se dosificó vehículo de PBS solo como control. Se obtuvieron imágenes de los ratones 48 horas después de la dosis usando el método descrito anteriormente. Los cambios en la producción de luz de luciferina se correlacionan directamente con los niveles de ARNm de luciferasa y representan una medida indirecta de la actividad de ARNip de luciferasa. Los resultados de eficacia *in vivo* se expresan como porcentaje de inhibición de la luminiscencia con respecto a los niveles de luminiscencia previos a la dosis. La administración sistémica de los RDV de ARNip de luciferasa disminuyó la expresión de luciferasa de una manera dependiente de la dosis. Se observó una mayor eficacia en ratones a los que se les administró el compuesto 1 que contenía RDV que con el RDV que contenía el lípido catiónico octil-CLinDMA (OCD) (figura 1). El OCD se conoce y se describe en el documento WO2010/021865. Se observó una eficacia similar en ratones a los que se les administró el compuesto 32 y 33 que contenían RDV en relación con el RDV que contenía el lípido catiónico MC3 (compuesto 46) (figura 11).

Ejemplo 2

40 Ensayo de unión a ApoE *in vitro*

Las LNP se incuban a 37 °C en suero de rhesus al 90 % a una concentración final de LNP de 4 µg/ml. La incubación es de 20 minutos con rotación orbitaria. Después de la incubación, las muestras se diluyen 1:20 en PBS y se colocan partes alícuotas de 100 µL de cada muestra diluida en pocillos de una placa de 96 pocillos recubierta con anticuerpo anti-PEG (Life Diagnostics n.º de catálogo P-0001PL). Después de una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora, la placa se lava 5 veces con 300 µl de PBS. Después del lavado, se añaden 50 µl de Triton X-100 al 0,2 % a cada pocillo y la placa se incuba a 37 °C durante 10 minutos, seguido de agitación en un agitador de placas durante 1 minuto a 750 rpm. Las muestras se congelan antes de realizar el ELISA de ApoE y el análisis de PCR de tallo-bucle de las muestras.

50 Se realiza un ensayo ELISA de ApoE para cuantificar la ApoE unida a las LNP después de la incubación en suero de rhesus. El anticuerpo anti-ApoE (Milipore, n.º de catálogo AB947) se diluye 1:1000 en PBS y se añaden 100 µL de anticuerpo diluido a cada pocillo de una placa de poliestireno de alta unión. La placa con el anticuerpo se incuba durante la noche a 4 °C, después de lo cual la placa se lava 2 veces con 200 µl de PBS. A continuación, se añaden 200 µl de tampón que contiene BSA al 1 % y Tween-20 al 0,05 % en PBS (tampón de incubación) a cada pocillo, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavan 5 veces con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Las muestras del ensayo de lisis de Triton congeladas se descongelan y se diluyen 1:6 con tampón de incubación y

ES 2 987 915 T3

5 se colocan partes alícuotas de 100 uL de muestra de ensayo en los pocillos de la placa de anticuerpos de ApoE. La incubación se realiza durante 1 hora a temperatura ambiente, seguida de un lavado 5X con PBS que contenía Tween-20 al 0,05 %. Después del lavado, se añaden 100 ul de anticuerpo anti-ApoE biotinilado (Mabtech, n.º de catálogo E887-biotina), diluido 1:500 en tampón de incubación, a cada pocillo y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente, seguido de un lavado 5X con Tween-20 al 0,05 % en PBS. A continuación, se añaden 100 ul por pocillo de estreptavidina-HPR (Thermo, n.º de catálogo TS-125-HR) y se incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar 5 veces con Tween-20 al 0,05 % en PBS, se añaden 100 ul de sustrato TMB (Thermo, n.º de catálogo 34028) a cada pocillo, seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 20 minutos en la oscuridad. La reacción colorimétrica se detiene con 100 ul de disolución de detención TMB (KPL, n.º de catálogo 50-85-04) y se determina la absorbancia a 450 nm. Se prepara una curva patrón de ApoE diluyendo ApoE recombinante de rhesus en tampón de incubación con Triton X-100 al 0,03 % con concentraciones que oscilan entre 100 ng/ml y 0,78 ng/ml. Los patrones de ApoE se evalúan en el ELISA en paralelo a las muestras de ensayo. Se utiliza un control de suero de rhesus solamente (sin LNP) para obtener una resta de fondo para la señal de ApoE no dependiente de LNP en el ELISA.

Protocolo de RT-PCR de tallo-bucle

15 Para normalizar la ApoE unida a la cantidad de LNP unida a la placa de anticuerpo anti-PEG, la cantidad de ARNip retenida en el pocillo del anticuerpo anti-PEG se cuantifica mediante PCR de tallo-bucle y se relaciona con el número de ARNip encapsulados por LNP, para dar una medida aproximada de las partículas totales de LNP unidas por pocillo.

Preparación de las muestras curvas patrón sembradas

20 La curva patrón se prepara usando el peso molecular del ARNip (13693 g/mol para ApoB 17063) para calcular el número de copias. El patrón alto debe contener 10^{11} copias por 3 µl. Se realiza una dilución en serie en 10 veces en una fila de una placa de ensayo hasta que el patrón más bajo contenga 10^2 copias por 3 µl. Se diluye Triton X-100 al 0,2 % 1:80 en agua y se pipetea 20 uL de Triton X-100 diluido en 10 pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añaden 30 ul de la curva patrón diluida en serie y la mezcla a cada pocillo de la placa. En la reacción de transcripción inversa se utilizan 10 ul de la curva patrón sembrada.

25 RT-PCR de tallo-bucle: muestras de ensayo y curva patrón

Los lisados de Triton de la captura de la placa de anticuerpos de PEG se diluyen de 1 a 2000 en agua libre de nucleasas. Se añaden 10 ul de la mezcla 'RT-Primer Mix' (kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA de Applied Biosystem, n.º de catálogo 4366596) a cada pocillo de una placa Micro-Amp QPCR de 96 pocillos (n.º de catálogo N801-0560 de ABI).

Componentes de la mezcla de cebadores de RT	uL/rxn	Concentración final
Cebador de RT de ApoB (10 uM)	0,6	200 nM
10x tampón	2	
Agua	7,4	

30

Secuencia del cebador de RT de ApoB: 5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

TTCGCACTGGATACGACCTTTAACA3' (SEQ ID NO:11)

35 Se colocan partes alícuotas de 10 uL de cada muestra de ensayo (diluida de 1 a 2000) o de curva patrón sembrada (arriba) en la placa de 96 pocillos. La placa se cubre con una estera (ABI n.º de catálogo N801-0550) para minimizar la evaporación. La placa se centrifuga brevemente a 800 rpm durante 1 minuto. A continuación, la placa se ejecuta en un termociclador utilizando los siguientes parámetros de ciclo:

Ciclado:	Temperatura	Tiempo
	94 °C	10 minutos
	75 °C	2 minutos
	60 °C	3 minutos
	50 °C	3 minutos
	40 °C	3 minutos
	30 °C	3 minutos
	4 °C	mantenimiento

A continuación, se añaden 10 ul de la mezcla 'RT Mix' a cada pocillo (kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA de Applied Biosystem, n.º de catálogo 4366596)

ES 2 987 915 T3

Componentes de la mezcla 'RT Mix'	uL/rxn
dNTP 100 mM	0,3
10x tampón RT	1
Inhibidor de RNAsa	0,38
Enzima de RT Multiscribe	1
Agua	7,32

- 5 La reacción de ciclado de RT se compone de 10 ul de muestra de ensayo, 10 ul de mezcla de cebador de RT y 10 uL de componentes de la mezcla 'RT Mix' para un volumen total de 30 ul. La concentración final del cebador de RT en el total de 30 ul de mezcla de RT total es 200 nM. Luego, la placa se sella con la misma estera de placa, se centrifuga brevemente a 800 rpm durante 1 minuto, luego se ejecuta en el termociclador utilizando los siguientes parámetros de ciclo:

Ciclado:	16 °C	30 minutos
	42 °C	30 minutos
	85 °C	5 minutos
	4 °C	mantenimiento

A continuación, se añaden 15 uL de mezcla de Fast Enzyme/cebador-sonda a cada pocillo de una nueva placa Fast de 96 pocillos (mezcla maestra de PCR TaqMan Fast Universal de Applied Biosystem, n° de catálogo 4352042)

<u>ApoB</u>		
Componentes de la mezcla maestra de PCR	uL/rxn	Concentración final
Mezcla de Fast Enzyme (2x disolución madre)	10	
cebador directo (100um)	0,18	900 nM
cebador inverso (100 uM)	0,18	900 nM
sonda (10uM)	0,05	250 nM
Agua	4,59	

- 10
- Secuencia de la sonda y los cebadores de ApoB:
- 17063DC F3: GGC GCGAAATTT CAGGAATTGT (SEQ ID NO:12)
- 17063DC Pr2: CACTGGATACGACCTTTAACA (SEQ ID NO:13)
- Universal R2: AGTGCAGGGTCCGAG (SEQ ID NO:14)
- 15 Se añaden 5 uL de cada reacción de RT a la placa Fast Enzyme Mix. La placa se centrifuga durante 1 minuto a 1000 rpm y el análisis QPCR se realiza en un ABI7900 con Fast Block. Los parámetros de ciclado son: 1 ciclo - 95 °C durante 20 segundos, seguido de 40 ciclos - 95 °C durante 1 segundo, 60 °C durante 20 segundos.

- 20 El resultado de QPCR se utiliza para calcular la concentración de ARNip en los lisados de Triton de la placa de captura de anticuerpos de PEG. En base a una estimación de 500 ARNip por partícula de LNP, se puede calcular el número de LNP retenidas en cada pocillo de la placa de anticuerpo anti-PEG. Usando la concentración de ApoE por pocillo, determinada mediante el ELISA de ApoE y el número de partículas de LNP por pocillo, se puede calcular un número aproximado de moléculas de ApoE unidas por partícula de LNP.

Número de moléculas de ApoE unidas por LNP

Compuesto	Moléculas de ApoE/LNP
8	4,9
16	3,3
24	1,2
25	13,7

ES 2 987 915 T3

28	4,7
29	38
32	12,8
33	18,1
34	2,3
45 (KC2)	32,5
46 (MC3)	14,5

Ejemplo 3

Ensayo de unión de heparina sefarosa HI-TRAP™

5 Las nanopartículas lipídicas (LNP) con carga superficial neutra no se retienen después de la inyección en heparina sefarosa con 1X disolución salina tamponada con fosfato (DPBS) de Dulbecco como tampón de ejecución, pero eluyen en el volumen vacío de la columna. La apolipoproteína E (ApoE) sérica exhibe una alta afinidad de unión con el sulfato de heparina y se demostró que las LNP se unen a la heparina sefarosa en un grado que depende de su capacidad intrínseca para unirse a ApoE (dependiendo de la composición de nanopartículas lipídicas y la concentración de ApoE) después de la incubación con ApoE humana purificada y/o recombinante o muestras de suero. Las nanopartículas de lípidos con ApoE unida a la superficie se unen a la heparina sefarosa con alta afinidad y se eluyen solo con alto contenido de sal (NaCl 1 M).

Se desarrolló un ensayo de unión a heparina sefarosa para evaluar la unión de la ApoE sérica a nanopartículas lipídicas basándose en la interacción de alta afinidad que los complejos ApoE-LNP exhiben hacia la heparina sefarosa.

Incubaciones

15 Las nanopartículas de lípidos se incubaron a 37 °C durante 20 min a una concentración final de ARNip de 50 µg/ml con varias concentraciones de apolipoproteína E humana purificada o recombinante o suero de rata/ratón/mono rhesus/humano al 0,1-50 % en 1X disolución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (DPBS). Después de la incubación con ApoE o suero, las muestras de LNP se diluyeron 10 veces usando 1X DPBS y se analizaron mediante cromatografía con heparina sefarosa. El área de pico de LNP retenida (después de restar las señales de blanco apropiadas) se compara con el área de pico total del control de LNP sin incubación con ApoE y/o suero para determinar el porcentaje de LNP que se desplaza hacia una interacción de heparina de alta afinidad después de la incubación con ApoE/suero.

Condiciones cromatográficas de heparina sefarosa HI-TRAP™

25 Una columna de cromatografía de heparina sefarosa HI-TRAP™ (GE Healthcare; volumen de lecho de 1 ml) se equilibra con PBS de Dulbecco 1X o 2X; se usa la concentración de sal 2X más alta para las LNP con mayor retención intrínseca en heparina sefarosa (probablemente debido a una mayor carga superficial positiva).

Fase móvil A: 1X o 2X DPBS

Fase móvil B: NaCl 1 M en tampón fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0

30 Administrar isocráticamente 100 % de A durante 10 min, seguido de un gradiente escalonado hasta 100 % de B; mantener durante 10 minutos más; aplicar de nuevo un gradiente escalonado hasta 100 % de A y reequilibrar durante 10 minutos adicionales antes de la inyección de la siguiente muestra

Caudal: 1 mL/min

Volumen de inyección de la muestra: 50 µL

Detección: UV a 260 nm

35 Resultados de la unión de HI-TRAP™ tras la incubación con suero de rhesus (condiciones 2X DPBS)

Compuesto	% unido
32	100
33	<5
45 (KC2)	58
46 (MC3)	7

Ejemplo 4

Evaluación de la eficacia y la toxicidad en rata *in vivo*

Las LNP que utilizan compuestos en las composiciones nominales descritas anteriormente se evaluaron para determinar la eficacia *in vivo* y los aumentos de alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa en ratas hembra Sprague-Dawley (CrI:CD (SD) (Charles River Labs). El ARNip se dirige al ARNm transcrito para el gen ApoB (número de registro NM 019287). La secuencia primaria y el patrón de modificación química del ARNip de ApoB se muestran anteriormente. Los RDV (que contienen ARNip) en el vehículo de PBS se inyectaron en la vena de la cola en un volumen de 1 a 1,5 ml. La tasa de infusión es de aproximadamente 3 ml/min. Se utilizaron cinco ratas en cada grupo de dosificación. Después de la administración de LNP, las ratas se colocan en jaulas con una dieta normal y agua presente. Seis horas después de la dosis, se retira el alimento de las jaulas. Se realiza la necropsia del animal 24 horas después de la dosis de LNP. Las ratas se anestesian con isoflurano durante 5 minutos, luego se mantienen bajo anestesia colocándolas en conos nasales y se continúa la administración de isoflurano hasta que se completa la exanguinación. La sangre se extrajo de la vena cava usando un equipo de venopunción de mariposa de calibre 23 y se dividió en partes alícuotas en Vacutainers de separación de suero para el análisis de la química del suero. Se toman punciones del lóbulo hepático caudado extirpado y se colocan en RNALater (Ambion) para el análisis de ARNm. El tejido hepático conservado se homogeneizó y el ARN total se aisló utilizando un molino de esferas Qiagen y el kit de aislamiento de ARN Qiagen miRNA-Easy siguiendo las instrucciones del fabricante. Los niveles de ARNm de ApoB hepáticos se determinaron mediante RT-PCR cuantitativa. El mensaje se amplificó a partir de ARN purificado utilizando un conjunto de sondas comerciales de ApoB de rata (Applied Biosystems n.º de catálogo RN01499054_ml). La reacción de PCR se realizó en un instrumento ABI 7500 con un Fast Block de 96 pocillos. El nivel de ARNm de ApoB se normalizó al ARNm de PPIB (NM 011149) interno. Los niveles de ARNm de PPIB se determinaron mediante RT-PCR usando un conjunto de sondas comerciales (Applied Biosystems n.º de catálogo Mm00478295_ml). Los resultados se expresan como una proporción de ARNm de ApoB/ARNm de PPIB. Todos los datos de ARNm se expresan en relación con la dosis control de PBS. Los análisis de ALT y AST en suero se realizaron en el analizador de química clínica Siemens Advia 1800 utilizando los reactivos de alanina aminotransferasa (nº de catálogo 03039631) y aspartato aminotransferasa (nº de catálogo 03039631) de Siemens. Se observó una eficacia similar y una tolerabilidad mejorada en ratas a las que se les administró el compuesto 32 o 33 que contenía RDV que con RDV que contenía el lípido catiónico DLinkC2DMA (compuesto 45) o MC3 (compuesto 46, figura 2).

Ejemplo 5

Determinación de los niveles de lípidos catiónicos en hígado de rata/mono

Se pesó tejido hepático en viales de 20 ml y se homogeneizó en 9 v/p de agua usando un GenoGrinder 2000 (OPS Diagnostics, 1600 golpes/min, 5 min). Se mezcló una parte alícuota de 50 µl de cada homogeneizado de tejido con 300 µl de disolvente de extracción/precipitación de proteínas (acetoneitrilo/metanol 50/50 que contenía un patrón interno 500 nM) y la placa se centrifugó para sedimentar la proteína precipitada. A continuación, se transfirió un volumen de 200 µl de cada sobrenadante a pocillos separados de una placa de 96 pocillos y se analizaron directamente muestras de 10 µl mediante LC/MS-MS.

Los patrones se prepararon sembrando cantidades conocidas de una disolución madre en metanol del compuesto en un homogeneizado de hígado de rata sin tratar (9 vol de agua/peso de hígado). Se mezclaron partes alícuotas (50 µl) de cada patrón/homogeneizado de hígado con 300 µl de disolvente de extracción/precipitación de proteínas (acetoneitrilo/metanol 50/50 que contenía un patrón interno 500 nM) y la placa se centrifugó para sedimentar la proteína precipitada. Se transfirió un volumen de 200 µl de cada sobrenadante a pocillos separados de una placa de 96 pocillos y se analizaron directamente 10 µl de cada patrón mediante LC/MS-MS.

Se realizó una cuantificación absoluta frente a los patrones preparados y extraídos del homogeneizado de hígado usando un sistema de HPLC Aria LX-2 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 4000 (Applied Biosystems). Para cada ejecución, se inyectó un total de 10 µl de muestra en una columna de HPLC BDS Hypersil C8 (Thermo, 50 x 2 mm, 3 µm) a temperatura ambiente.

Fase móvil A: H₂O al 95 %/metanol al 5 %/formiato de amonio 10 mM/ácido fórmico al 0,1 %. *Fase móvil B:* metanol al 40 %/n-propanol al 60 %/formiato de amonio 10 mM/ácido fórmico al 0,1 %. El caudal fue de 0,5 ml/min y el perfil de elución en gradiente fue el siguiente: mantener a 80 % de A durante 0,25 min, rampa lineal hasta 100 % de B a lo largo de 1,6 min, mantener a 100 % de B durante 2,5 min, luego volver y mantener a 80 % de A durante 1,75 min. El tiempo total de ejecución fue de 5,8 min. Los parámetros de la fuente API 4000 fueron CAD: 4, CUR: 15, GS1: 65, GS2: 35, IS: 4000, TEM: 550, CXP: 15, DP: 60, EP: 10.

En ratas a las que se les administró el compuesto 32 o 33 que contenían RDV, los niveles hepáticos fueron similares o inferiores a los RDV que contenían el lípido catiónico DLinkC2DMA (compuesto 45) o MC3 (compuesto 46, figura 3). En monos a los que se les administró el compuesto 32 o 33 que contenían RDV, los niveles hepáticos fueron más bajos que los RDV que contenían el lípido catiónico DLinkC2DMA (compuesto 45) o MC3 (compuesto 46, figura 7).

Ejemplo 6

Evaluación *in vivo* en mono rhesus de la eficacia de ApoB

Las LNP que utilizan compuestos en las composiciones nominales descritas anteriormente, se evaluaron para la eficacia *in vivo* en monos *Macaca mulatta* (rhesus) machos o hembras. El ARNip se dirige al transcrito de ARNm para el gen ApoB (n.º de registro XM 001097404). La secuencia primaria y el patrón de modificación química del ARNip de ApoB se muestran anteriormente. Los RDV (que contienen ARNip) en el vehículo de PBS se administraron mediante inyección intravenosa en la vena safena a una tasa de inyección de 20 ml/minuto hasta un nivel de dosis de ARNip 0,25 mg/kilogramo. Los volúmenes de inyección fueron de 1,9 a 2,1 ml/kilogramo y los monos variaron en peso de 2,5 a 4,5 kilogramos. El control PBS o RDV se administró a tres monos. En varios días después de la dosis, se extrajeron muestras de sangre de 1 ml de la arteria femoral para el análisis químico del suero. Los monos se mantuvieron en ayunas durante la noche antes de las extracciones de sangre. Como medida de la eficacia, se controló el LDL-C como marcador sustituto corriente abajo de la reducción del ARNm de ApoB. A los 4 días de la administración sistémica de RDV que contenían los compuestos 32 y 33 (0,25 mg/kg), los niveles séricos de LDL-C se redujeron a menos del 30 % de los niveles previos a la dosis (figura 4).

Ejemplo 7

Evaluación *in vivo* en mono rhesus de la eficacia de la β -catenina

El día -7 del estudio se recogieron muestras de biopsia hepática antes de la dosis (aproximadamente 0,5-1 gramo/muestra) de monos rhesus machos mediante resección quirúrgica laparoscópica (resección de una muestra de biopsia del borde exterior de un lóbulo hepático seleccionado al azar por mono). Se utilizó un punzón para tejidos de 5 mm para tomar muestras de tres muestras no adyacentes de aproximadamente 50 mg de cada biopsia previa a la dosis. Las muestras se conservaron en RNAlater™ (Ambion) para su posterior análisis de ARNm de CTNNB1.

En el día 0 del estudio se administraron a los monos suspensiones de los artículos de ensayo de nanopartículas lipídicas (LNP) en disolución salina tamponada con fosfato (0,05-0,1 mg de ARNip/ml) mediante una inyección intravenosa en embolada de dosis única a unas dosis diana de 0,67, 1,34 o 3,34 mg de ARNip/m². A efectos de la dosificación, el área de superficie corporal (m²) se calculó a partir del peso corporal (PC) según la relación de escala alométrica establecida que se indica a continuación (1):

$$BSA (m^2) = 0,11 * PC(en kg)^{0,65}$$

En los días de estudio 2 y 7, a las 48 horas y 168 horas después de la administración de las LNP, se recolectaron muestras de biopsia hepática (aproximadamente 0,5-1 gramo/muestra) de monos mediante resección quirúrgica laparoscópica (se resecaron 2 lóbulos hepáticos distintos seleccionados al azar por mono). Se utilizó un punzón para tejidos de 5 mm para tomar muestras de tres muestras no adyacentes de aproximadamente 50 mg por cada muestra de biopsia quirúrgica de 48 horas y 168 horas. Las muestras se conservaron en RNAlater™ (Ambion) para un posterior análisis de ARNm de CTNNB1.

Los niveles de ARNm de CTNNB1 se midieron mediante RT-PCR cuantitativa relativa utilizando un conjunto de cebador/sonda validado para CTNNB1 y normalizado frente a los niveles de ARNm de peptidilprolil isomerasa B (también conocida como PPIB o ciclofilina B) y los niveles de ARN de ARN ribosómico 18S (ARNr 18S). El cambio en la expresión hepática del ARNm de CTNNB1 se midió como la diferencia en el número de ciclo umbral de PCR ($\Delta\Delta Ct$) entre las muestras posteriores a la dosis y las muestras de hígado correspondientes a cada mono antes de la dosis.

El cálculo de la inactivación del ARNm de CTNNB1 (con respecto a los niveles de pretratamiento) se calculó a partir de $\Delta\Delta Ct$ utilizando la siguiente relación:

$$ARNm (\% \text{ de inactivación}) = 100 - (100/2^{\Delta\Delta Ct})$$

Los monos dosificados con RDV que contenían los compuestos 32 y 33 y ARNip de beta-catenina demostraron una KD robusta en dosis que van desde 0,67-3,34 mg/m² (figura 5).

(1) Documento de orientación de la FDA: "Guía para la industria: estimación de la dosis inicial máxima segura en ensayos clínicos iniciales para productos terapéuticos en voluntarios adultos sanos", julio de 2005, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., Administración de Alimentos y Medicamentos, Centro de Evaluación e Investigación de Medicamentos (CDER)

Ejemplo 8

Evaluación *in vivo* en mono rhesus del aumento en ALT

La alanina aminotransferasa (ALT) se mide en suero que se recolecta de sangre entera de mono coagulada después

de la centrifugación. Un analizador químico automatizado de Roche Modular System mide la actividad enzimática de ALT en el suero mediante el uso de reactivos y procedimientos convencionales de la Federación Internacional de Química Clínica. El ordenador del analizador usa mediciones de absorbancia para calcular la actividad ALT en la muestra en comparación con una curva patrón. La actividad ALT se indica en Unidades Internacionales por Litro (UI/L).

- 5 Los monos dosificados con RDV que contenían los compuestos 32 y 33 presentaba elevaciones máximas de ALT más bajas que los que recibieron el RDV que contenía el lípido catiónico DLinKC2DMA (compuesto 45) o MC3 (compuesto 46, figura 6).

Ejemplo 9

Evaluación en un modelo de ratón con carcinoma hepatocelular

- 10 La actividad de las LNP en el suministro de un ARNip de β -catenina (ARNip β -cat) al carcinoma hepatocelular se evaluó en un modelo de carcinoma hepatocelular ("hepatocelular carcinoma", HCC) de ratón, denominado TRE-MET. Los ratones TRE-MET son ratones transgénicos en un trasfondo genético FVB/N, en el que el transgén MET humano se expresa bajo un promotor hCMV con operadores tet secuencia arriba heptamerizados. Cuando los ratones TRE-MET se cruzan con la línea LAP-tTA, los ratones doblemente transgénicos (TRE-MET/LAP-tTA) expresan MET de una
15 manera específica del hígado que puede reprimirse mediante la administración de doxiciclina. Estos ratones desarrollan HCC aproximadamente a los 3 meses de edad con nódulos tumorales identificables visualmente en la superficie del hígado, y los tumores muestran un patrón de crecimiento trabecular difuso típico del HCC y expresan el marcador tumoral alfa-fetoproteína (AFP) del HCC. Además, el análisis de mutaciones en el tumor de ratones TRE-MET también ha identificado mutaciones activadoras en el gen de la beta-catenina en aproximadamente el 95 % de
20 los tumores. Estas características hacen que el modelo de ratón TRE-MET HCC sea adecuado para evaluar el suministro de ARNip de β -catenina mediado por LNP y la eficacia resultante sobre el crecimiento tumoral.

- El efecto de los LNP que contenían β -catenina para silenciar el ARNm de β -catenina tanto en el hígado como en los tejidos tumorales se evaluó por primera vez en un estudio farmacodinámico ("pharmacodynamic", PD) en ratones TRE-MET portadores de tumores. Se administraron por vía intravenosa diferentes dosis de LNP o una dosis alta de ARNip control de LNP y, 72 horas después, se realizó una necropsia para recolectar tejidos hepáticos y tumorales para la
25 determinación de los niveles de ARNm de β -catenina mediante Taqman. Como se muestra en las figuras 8 y 9, el compuesto 33 indujo una inactivación robusta y dependiente de la dosis del ARNm de β -catenina tanto en el hígado como en los tejidos tumorales, mientras que no se observó inactivación de la β -catenina en los animales que recibieron ARNip control o PBS. Unos niveles de 0,1 mpk y 0,05 mpk de LNP indujeron 88 % y 69 % de KD en hígado normal, respectivamente. La KD en los tumores oscila entre el 70 % (2 mpk) y aproximadamente el 40 % (0,1 o 0,05 mpk). Como se muestra en las figuras 12 y 13, el compuesto 32 indujo una inactivación robusta y dependiente de la dosis del ARNm de β -catenina tanto en el hígado como en los tejidos tumorales, mientras que no se observó inactivación de la β -catenina en los animales que recibieron ARNip control o PBS. Unos niveles de 0,1 mpk y 0,05 mpk de LNP indujeron 76 % y 78 % de KD en hígado normal, respectivamente. La KD en los tumores varía desde el 47 % (0,25
35 mpk) hasta aproximadamente el 20-30 % (0,1 o 0,05 mpk).

- El efecto de las LNP sobre el crecimiento tumoral se evaluó en un estudio de eficacia de dosis múltiples. A los ratones TRE-MET HCC se les administró el compuesto 33/ARNip β -cat, el compuesto 32/ARNip β -cat, ARNip control o PBS semanalmente durante 3 semanas (3 dosis), y se determinó el volumen tumoral en cada animal 7 días antes de la
40 1ª dosis y 3 días después de la dosis final mediante barrido microCT (figuras 10 y 14). Además, 7 días después de la dosis final, se recogieron tejidos tumorales y de hígado para la evaluación de los niveles de ARNm de β -catenina. Mientras que los ratones que recibieron PBS o ARNip control mostraron un crecimiento del 360-470 % en la carga tumoral, los ratones tratados con el compuesto 33/ARNip β -cat exhibieron una intensa inhibición o regresión del crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis (figura 10). Los niveles de 2 mpk y 0,5 mpk de compuesto 33/ARNip β -cat indujeron 60 % y 40 % de regresión tumoral, respectivamente, y el nivel de 0,05 mpk provocó estasis tumoral. Mientras que los ratones que recibieron PBS o ARNip control mostraron un crecimiento de aproximadamente 350 % en la carga tumoral, los ratones tratados con el compuesto 32/ARNip β -cat exhibieron una
45 intensa inhibición o regresión del crecimiento tumoral de una manera dependiente de la dosis (figura 14). Los niveles de 0,5, 0,25 y 0,1 mg/kg de compuesto 32/ARNip β -cat indujeron 37, 58 y 37 % de regresión tumoral, respectivamente, y el nivel 0,05 mpk provocó estasis tumoral.

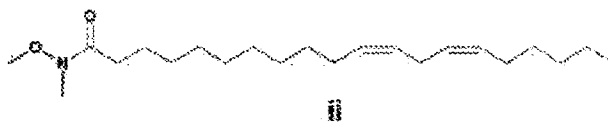
50

REIVINDICACIONES

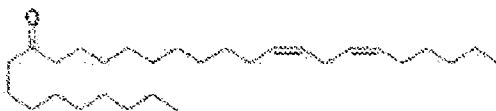
1. Un método para la preparación de un lípido catiónico, o cualquier sal o estereoisómero farmacéuticamente aceptable del mismo, seleccionado de:

- (20Z,23Z)-N,N-dimetilnonacosa-20,23-dien-10-amina (Compuesto 1);
- 5 (15Z,18Z)-N,N-dimetiltetracosa-15,18-dien-5-amina (Compuesto 9);
- (14Z,17Z)-N,N-dimetiltricosa-14,17-dien-4-amina (Compuesto 10);
- (19Z,22Z)-N,N-dimetiloctacosa-19,22-dien-9-amina (Compuesto 11);
- (18Z,21Z)-N,N-dimetilheptacosa-18,21-dien-8-amina (Compuesto 12);
- (17Z,20Z)-N,N-dimetilhexacosa-17,20-dien-7-amina (Compuesto 13);
- 10 (16Z,19Z)-N,N-dimetilpentacosa-16,19-dien-6-amina (Compuesto 14);
- (20Z,23Z)-N-etil-N-metilnonacosa-20,23-dien-10-amina (Compuesto 21);
- 1-[(11Z, 14Z) -1-nonilicosa-11,14-dien-1-il]pirrolidina (Compuesto 22) ;
- (12Z,15Z)-N,N-dimetil-2-nonilhenicosa-12,15-dien-1-amina (Compuesto 31);
- (13Z, 16Z)-N,N-dimetil-3-nonildocosa-13,16-dien-1-amina (Compuesto 32);
- 15 N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]heptadecan-8-amina (Compuesto 33);
- N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]hexadecan-8-amina (Compuesto 38);
- N,N-dimetil-1-[(1S,2R)-2-octilciclopropil]pentadecan-8-amina (Compuesto 43); y
- (11E, 20Z, 23Z) -N, N-dimetilnonacosa-11,20,23-trien-10-amina (Compuesto 44) ;
- usando uno o más compuestos intermedios seleccionados de las fórmulas ii, iii, v, vii, viii, x y xv

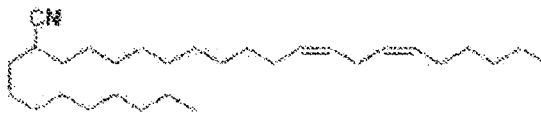
20



ii

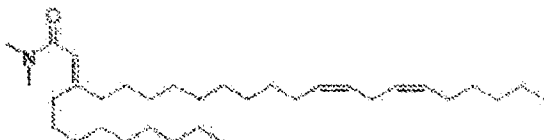


iii

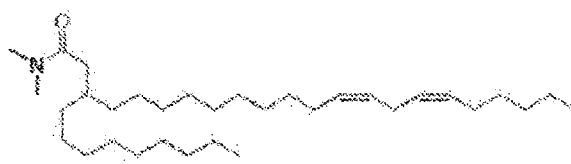


v

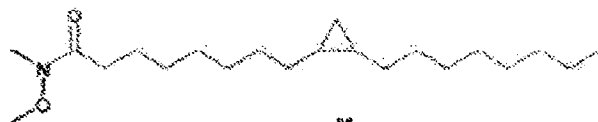
25



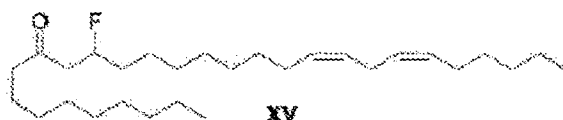
viii



VIII



X



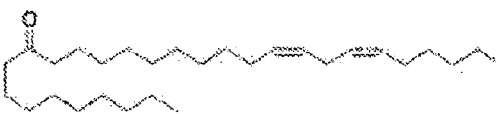
XV

5

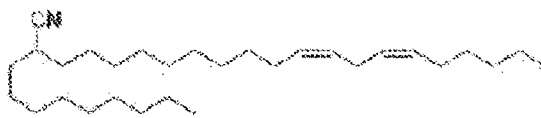
2. Un compuesto seleccionado de las Fórmulas ii, iii, v, vii, viii, x y xv



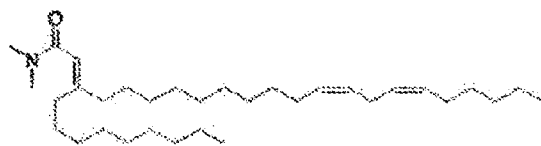
ii



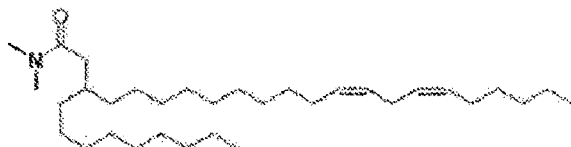
iii



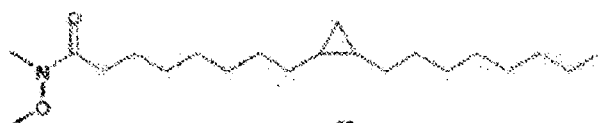
v



vii



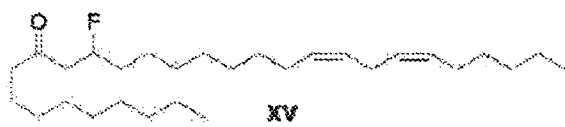
viii



x

10

15



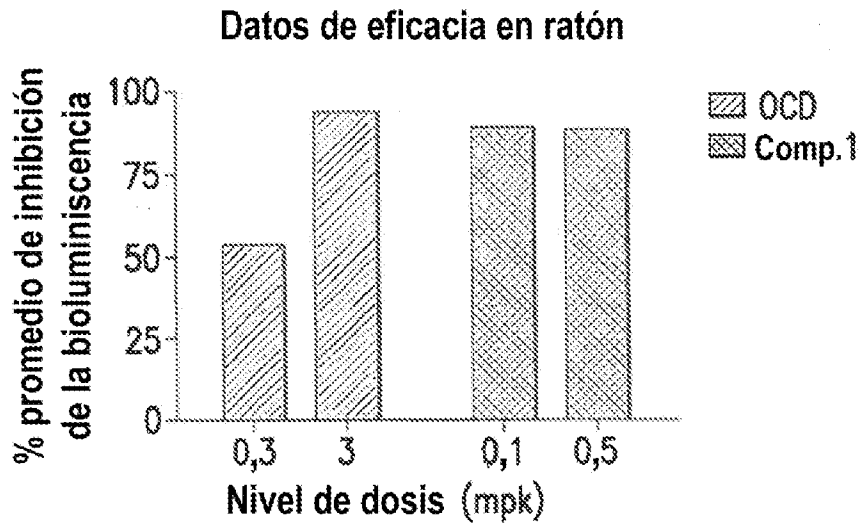


FIG. 1

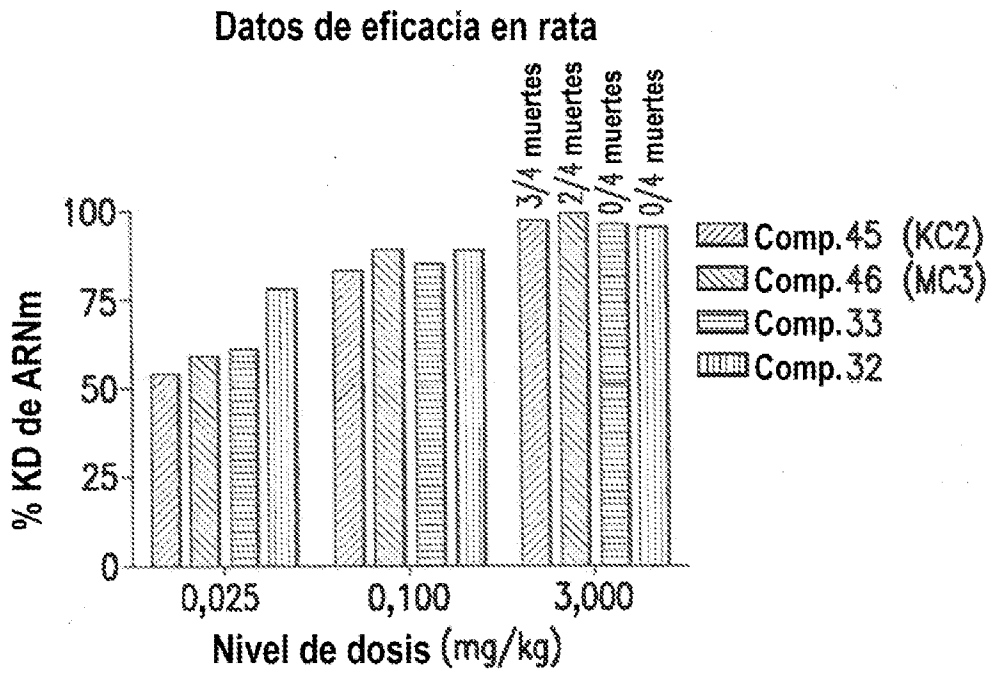


FIG. 2

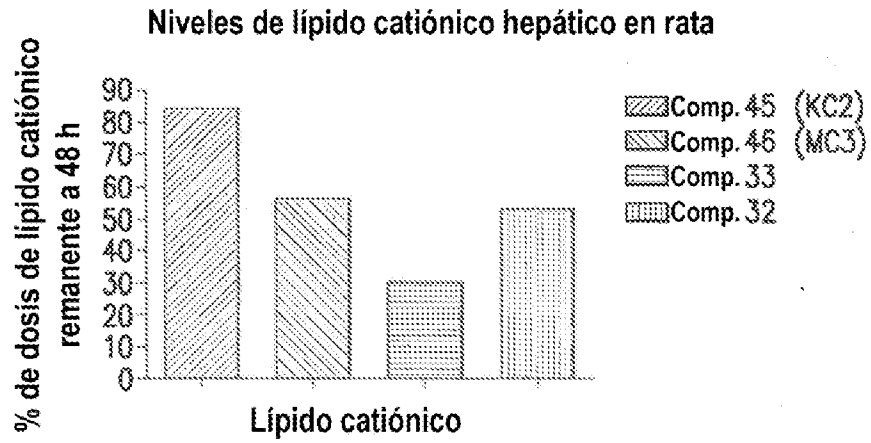


FIG.3

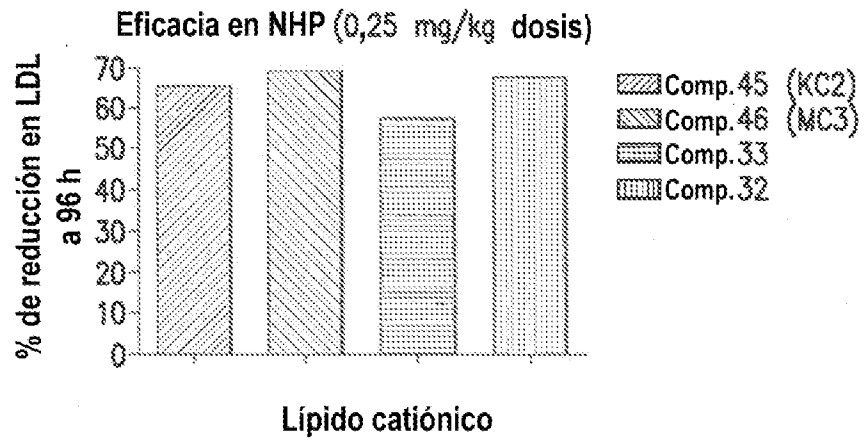


FIG.4

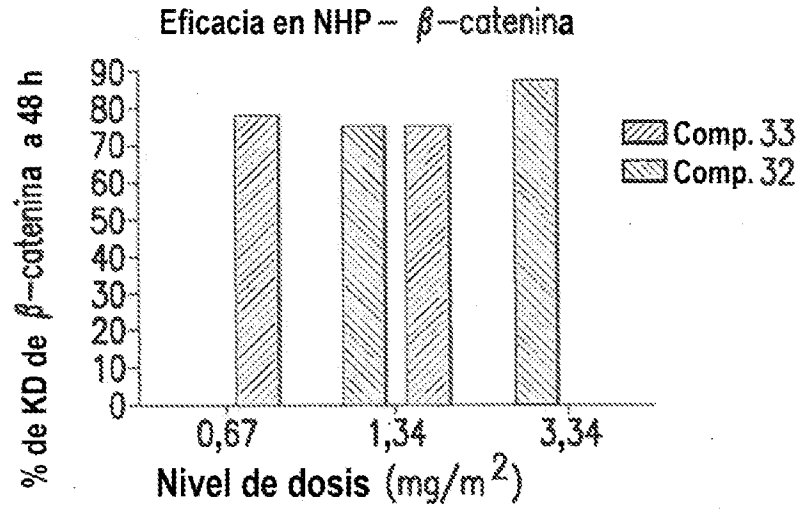


FIG.5

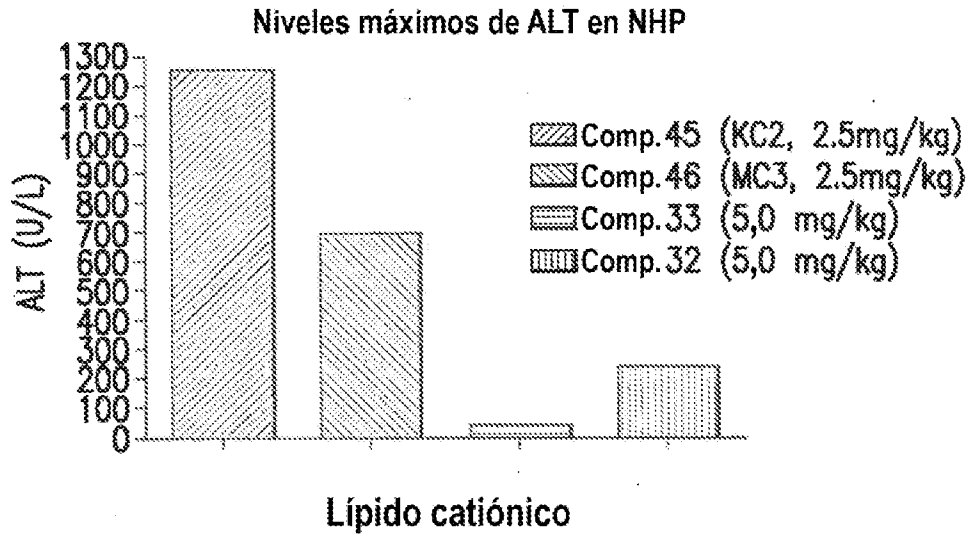


FIG.6

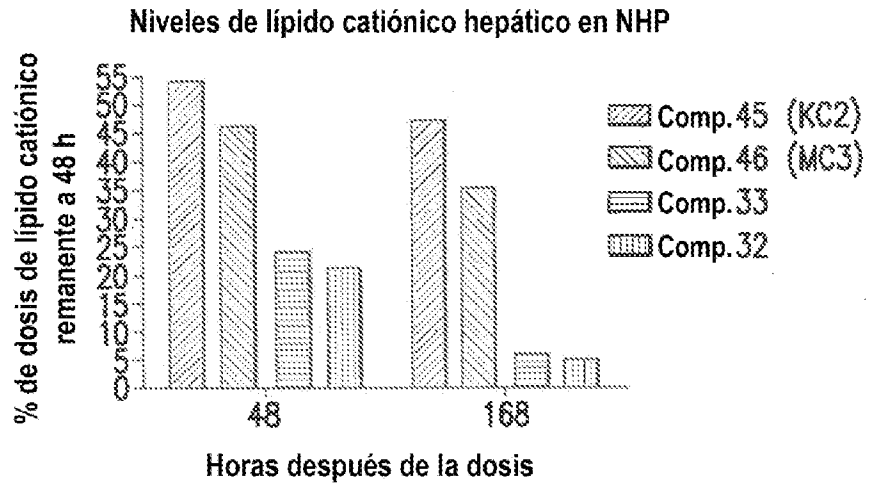


FIG. 7

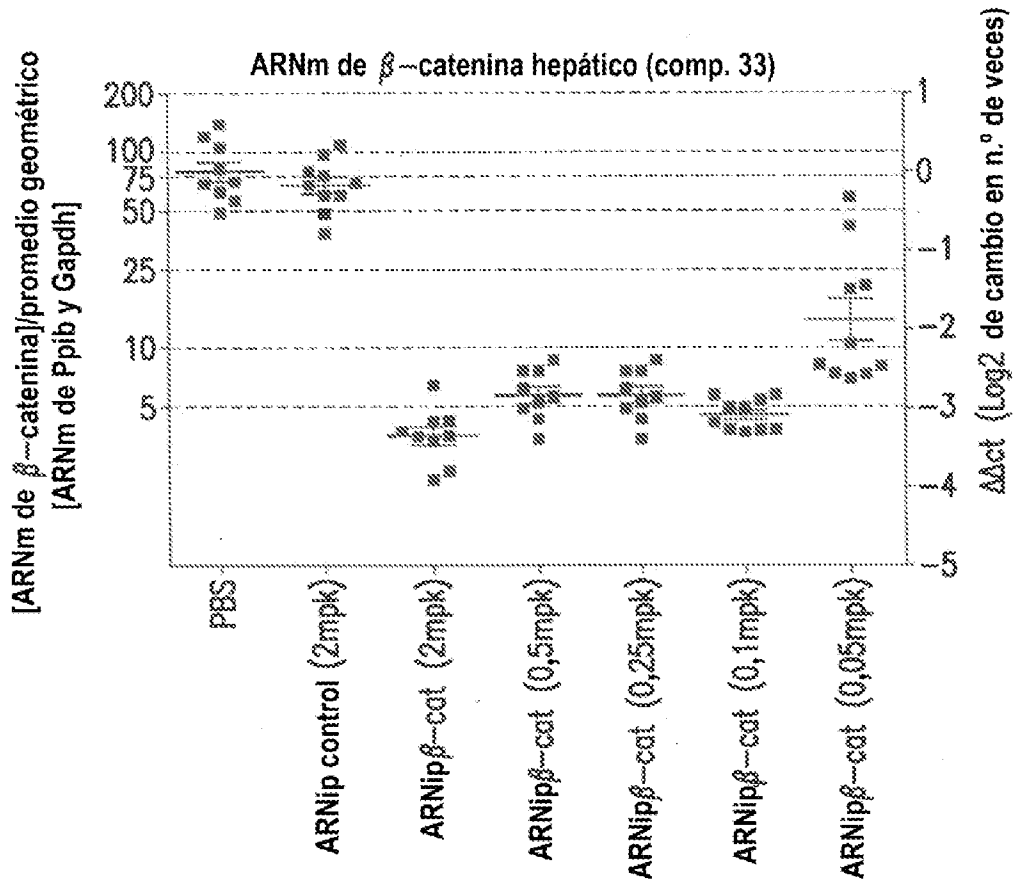


FIG. 8

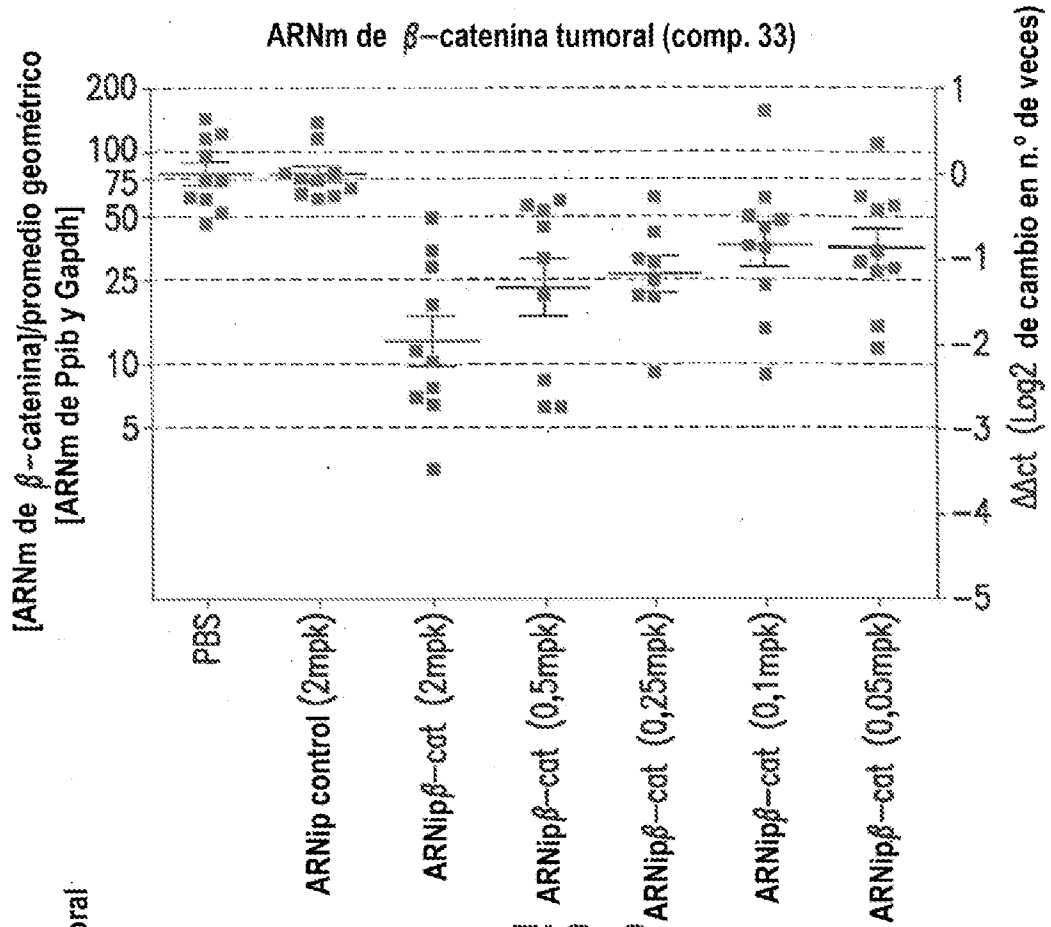


FIG. 9

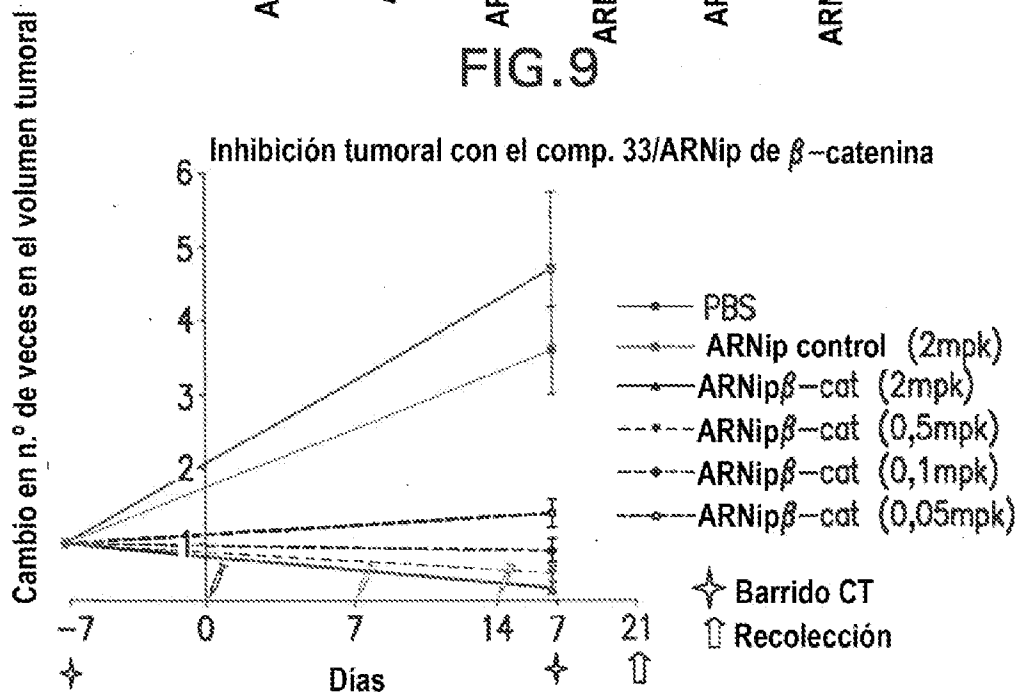


FIG. 10

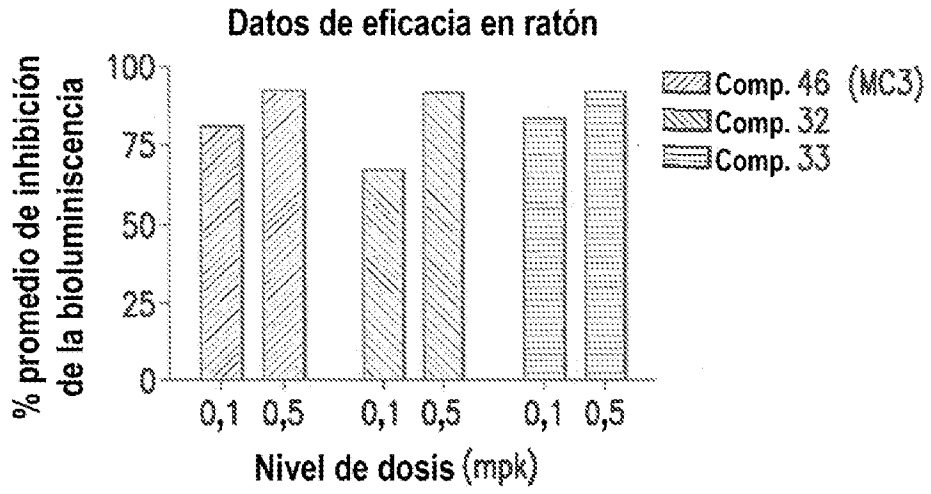


FIG. 11

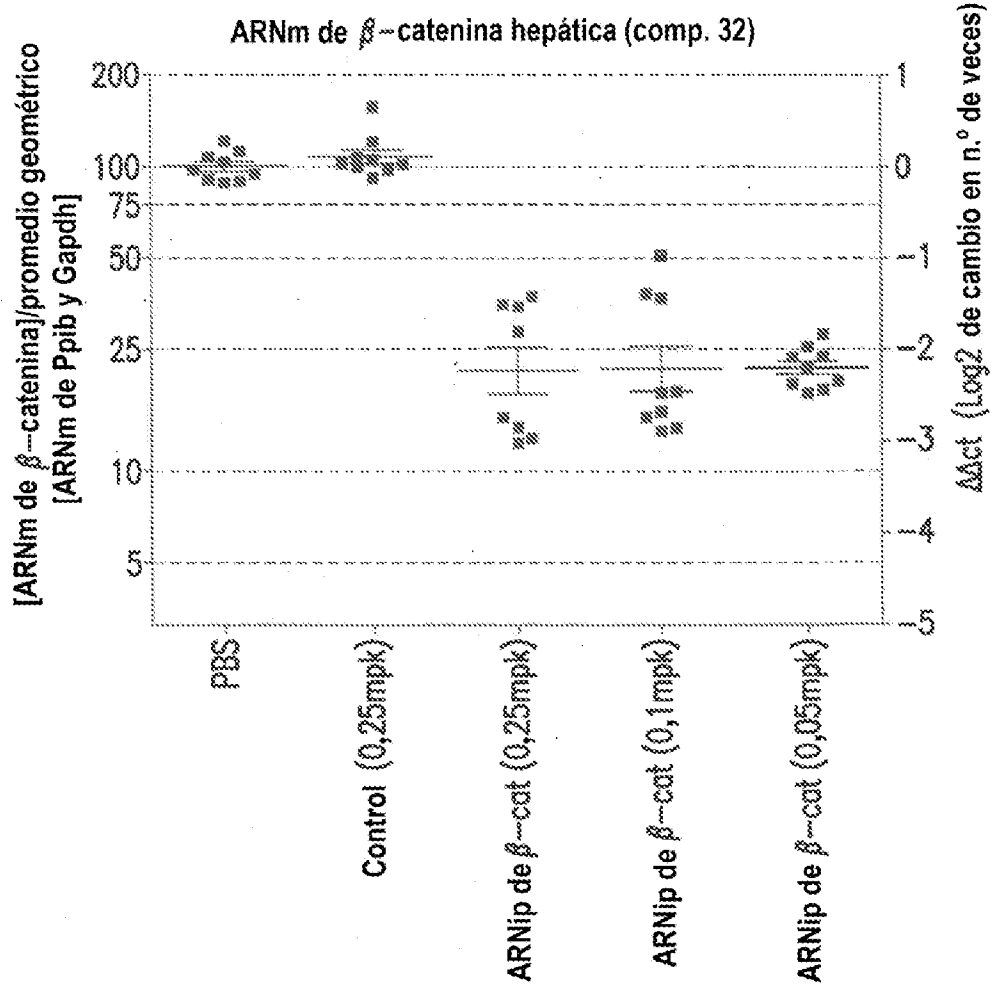


FIG. 12

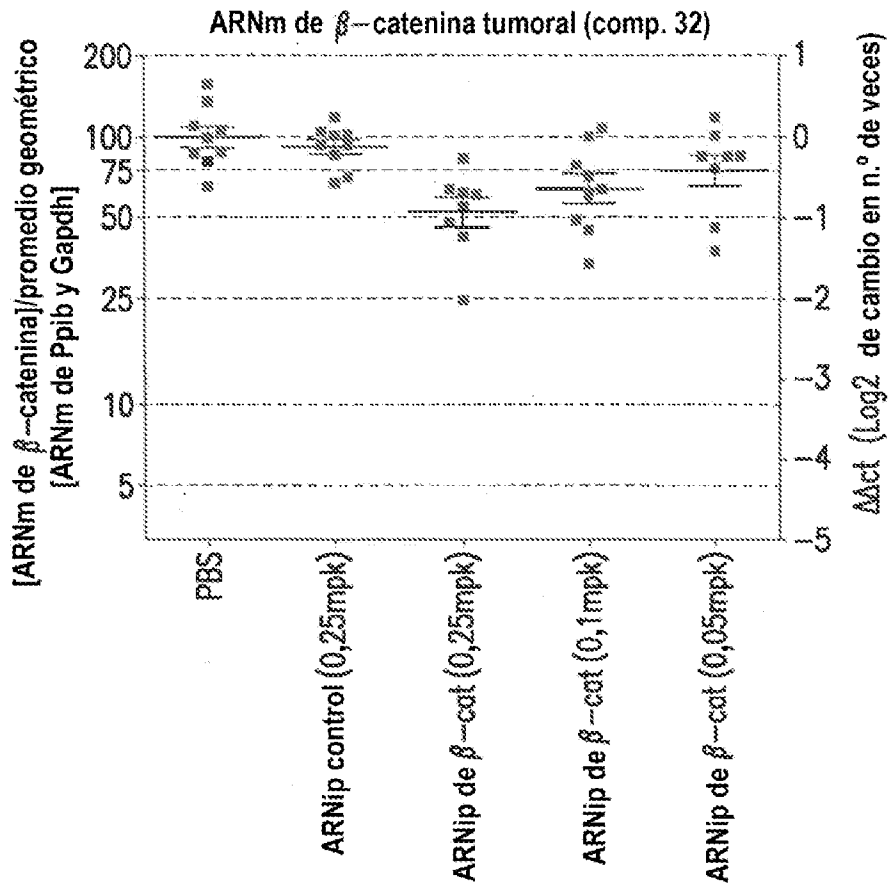


FIG. 13

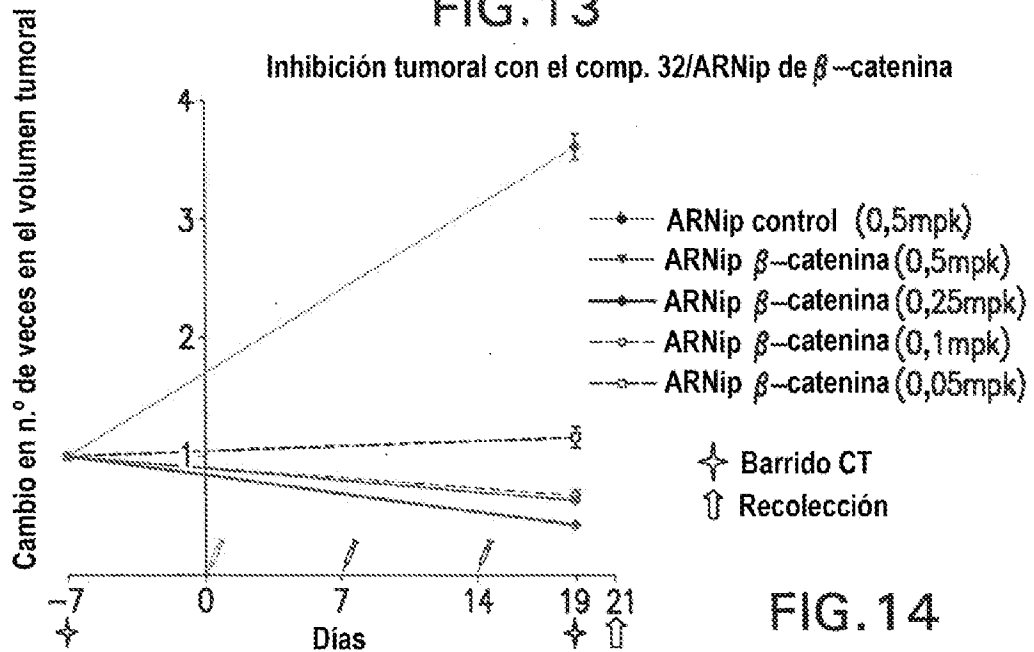


FIG. 14