

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 002 193**

51 Int. Cl.:

A61K 47/54 (2007.01)

A61K 47/55 (2007.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.06.2021** **PCT/NL2021/050384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.12.2021** **WO21261992**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.06.2021** **E 21734241 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024** **EP 4171641**

54 Título: **Conjugado de galnac y saponina, composición terapéutica que comprende dicho conjugado y un conjugado de galnac-oligonucleótido**

30 Prioridad:

24.06.2020 NL 2025899

10.09.2020 NL 2026442

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.03.2025

73 Titular/es:

SAPREME TECHNOLOGIES B.V. (100.00%)
Antonie van Leeuwenhoeklaan 9 Building A12-1
3721 MA Bilthoven, NL

72 Inventor/es:

POSTEL, RUBEN y
HERMANS, GUY

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones:

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

ES 3 002 193 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

Conjugado de galnac y saponina, composición terapéutica que comprende dicho conjugado y un conjugado de galnac-oligonucleótido

CAMPO TECNOLÓGICO

La invención se refiere a un conjugado de saponina que comprende una saponina unida covalentemente a un ligando para ASGPR, comprendiendo el ligando al menos una GalNAc. La invención también se refiere a una combinación farmacéutica que comprende una primera composición farmacéutica que comprende el conjugado de saponina de la invención y una segunda composición farmacéutica que comprende un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión para unirse a una molécula de la superficie celular. Además, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el conjugado de saponina de la invención y el segundo conjugado o el tercer conjugado. Adicionalmente, la invención se refiere a una combinación farmacéutica o composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento. La invención también se refiere a una combinación farmacéutica o composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o problema de salud en el que interviene un producto de expresión de los genes: apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, gen X del VHB, gen S del VHB, AAT y LDH, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una infección vírica, hipercolesterolemia, hiperoxaluria primaria, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad hepática relacionada con AAT, porfiria hepática aguda, amiloidosis por TTR, enfermedad mediada por el complemento, infección por hepatitis B o una enfermedad autoinmunitaria. Finalmente, la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para transferir el segundo conjugado o el tercer conjugado de la invención desde el exterior de una célula hacia el interior de dicha célula.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La capacidad para inhibir la función de una proteína, ya sea en seres humanos o en patógenos, constituye una parte integral del descubrimiento de nuevos fármacos. Los fármacos que son moléculas de bajo peso molecular convencionales, así como también los anticuerpos, se ven muy limitados a un subconjunto de las dianas disponibles. Las moléculas de bajo peso molecular se unen principalmente a sitios de cofactores o sitios de transmisores, en efecto sitios que están diseñados para acomodar moléculas de bajo peso molecular. Los anticuerpos se pueden unir a una mayor variedad de proteínas pero habitualmente se ven limitados a dianas extracelulares.

La terapia de oligonucleótidos es un campo relativamente reciente y que se está desarrollando con rapidez, que tiene como objetivo resolver muchos de los problemas con los que se encuentran los fármacos que son moléculas de bajo peso molecular y los fármacos que son anticuerpos, manipulando directamente la transcripción genética y las vías de traducción. La potencia y versatilidad de los oligonucleótidos, en particular la posibilidad de suprimir genes que codifican proteínas que no son quimiomodulables ("undruggable") mediante fármacos clásicos que son moléculas de bajo peso molecular, hace que sean candidatos atractivos para fármacos. Los primeros fármacos oligonucleotídicos se basaron en la tecnología antisentido, mediante la cual moléculas de ácido nucleico monocatenario se unirían con especificidad secuencial a su diana de ARNm complementario, con lo que se desencadenaría de este modo la degradación del dúplex por parte del sistema de la RNasa H.

En 1998, Andrew Fire y Craig Mello publicaron un artículo crucial que identificaba ARN bicatenarios (ARNbc) como los agentes causantes del silenciamiento génico postranscripcional (PTGS, por sus siglas en inglés) en *Caenorhabditis elegans*, un fenómeno que denominaron interferencia por ARN (iARN). El descubrimiento de la iARN dio explicación a observaciones desconcertantes del silenciamiento génico en plantas y hongos y dio inicio a una revolución en biología que finalmente demostró que los ARN no codificantes son reguladores centrales de la expresión génica en organismos multicelulares. Poco tiempo después, se descubrió que los ARNbc pequeños (normalmente de 15-30 pb) pueden inducir catalíticamente el silenciamiento por iARN en células de mamífero sin provocar respuestas de interferón no específicas. El hecho de actuar sobre la vía de iARN a través de ARNbc pequeños, tales como los ARN interferentes pequeños (ARNip) y el ARN de horquilla corta (ARNhc), presenta varias ventajas teóricas en comparación con el antisentido, ya que es notablemente más eficaz (catalítico) y proporciona una inhibición más prolongada de la expresión génica. Esto podría traducirse en unas dosis más bajas y unos costos más bajos junto con una dosificación menos frecuente. Las exposiciones más bajas también podrían significar menos problemas de toxicidad para el ARNip.

Sin embargo, antes de que el ARNip llegue a su diana *in vivo*, se enfrenta a una serie de barreras importantes que bloquean su camino hacia la maquinaria del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Al entrar en el torrente sanguíneo, el ARNip es vulnerable a la degradación por parte de nucleasas

endógenas y a la excreción renal debido a su pequeño tamaño y fuerte carácter aniónico. Además, antes de llegar a su célula diana, el ARNip debe navegar por las estrechas intersecciones endoteliales de los vasos sanguíneos y difundirse a través de la matriz extracelular. Debido a sus numerosas cargas negativas, el ARNip tiene dificultades para unirse a la membrana celular y cruzarla y, una vez dentro de las células, debe escaparse de los endosomas para interactuar con sus dianas proteicas intracelulares.

Por lo tanto, el éxito de la terapia de oligonucleótidos (como el ARNip) depende en gran medida de un suministro eficaz del fármaco desde el exterior de una célula al citosol. En consecuencia, se dedica mucha atención al desarrollo de sistemas de suministro que mejoren el suministro de oligonucleótidos (tales como el ARNip). Además del suministro vírico, los principales métodos empleados para mejorar el suministro de ARNip (u otros oligonucleótidos) a la célula emplean liposomas, péptidos de penetración celular (CPP, por sus siglas en inglés) y sus miméticos, o nanopartículas (Gooding, Matt *et al. Chemical biology & drug design* 80,6 (2012): 787-809). Se considera que cuestiones de seguridad, tales como la posibilidad de mutagénesis e inmunogénesis por inserción, limitan el futuro de las estrategias víricas.

Los liposomas son el vector de suministro utilizado más habitualmente para oligonucleótidos tales como el ARNip, donde el oligonucleótido se encapsula dentro de una bicapa lipídica. El suministro de oligonucleótidos liposomales presenta varios problemas tales como toxicidad mediada por radicales de oxígeno (típica de los liposomas catiónicos), toxicidad celular, efectos sobre la regulación génica y respuestas inflamatorias. Además, parece ser que el suministro *in vivo* utilizando lípidos tiene como diana predominantemente el hígado y el bazo.

Los péptidos de penetración celular (CCP), también denominados dominios de transducción de proteínas, son péptidos cortos (generalmente con una longitud < 30 residuos aminoácidos) que tienen la propiedad inusual de ser capaces de cruzar la membrana celular. A través de la unión covalente al oligonucleótido o a través de la formación de complejos no covalentes con el oligonucleótido, un CPP puede fomentar la captación celular del oligonucleótido. El campo del suministro de oligonucleótidos mediado por CPP es extremadamente complejo ya que combina los retos planteados tanto por la tecnología de oligonucleótidos como por la tecnología de péptidos, dos campos que están lejos de alcanzar su madurez, en un solo fármaco. Además de los problemas relacionados con los oligonucleótidos, los retos habituales con los que se encuentran los CPP se relacionan con la (falta de) estabilidad *in vivo* de la cadena peptídica, lo que a menudo requiere el uso de derivados peptídicos no naturales que pueden tener una síntesis compleja y/o exhibir una actividad de penetración celular reducida.

A pesar del suministro celular mejorado, el hecho de resolver el problema del atrapamiento por parte de los endosomas es uno de los principales retos del diseño de CPP y otros sistemas de transporte que sean eficientes (Gooding *et al.*).

Las nanopartículas y los nanoportadores son sistemas de suministro de oligonucleótidos a nanoescala que normalmente comprenden un polímero, estabilizantes biológicos y ligandos que tienen una célula como diana en forma de un complejo con el oligonucleótido. Un sistema nanoportador de ARNip ilustrativo se conoce con el nombre de policonjugados dinámicos de ARNip. Este sistema se basa en un polímero anfipático unido a polietilenglicol (PEG) como estabilizante biológico y un ligando que tiene como diana los hepatocitos donde el ARNip se une covalentemente al polímero mediante un puente de disulfuro. Los restos de direccionamiento y los restos de PEG se unen al polímero a través de enlaces de maleamato, de manera que forman nanopartículas con carga negativa, que no se unen a las proteínas séricas. Después de la internalización por endocitosis, los enlaces de maleamato se hidrolizan fácilmente al acidificarse el endosoma, con lo que se exponen los grupos amino catiónicos del polímero y se induce el escape endosomal a través de un efecto de esponja de protones. También se conocen nanoportadores en forma de polímeros catiónicos tales como las polietileniminas (PEI) (a veces combinadas con ciclodextrinas), que pueden formar complejos electrostáticos con oligonucleótidos tales como el ARNip, lo que brinda protección contra la degradación y facilita la internalización. Sin embargo, la toxicidad a concentraciones más altas como resultado de la ruptura de la membrana y la inducción de la apoptosis pueden limitar las aplicaciones de los polímeros catiónicos como agente de suministro terapéutico. Además de la compleja preparación de las nanopartículas y los nanoportadores, su estabilidad a largo plazo es una barrera importante para su uso viable desde el punto de vista comercial.

Las lipoproteínas que provocan enfermedades cardiovasculares, tales como LDL, lipoproteínas remanentes y Lp(a), pueden reducirse utilizando terapias de silenciamiento génico que tienen como diana la apolipoproteína (ApoB), que es una proteína que desempeña un papel importante en la producción o eliminación de estas lipoproteínas. Se han aplicado estrategias basadas en oligonucleótidos antisentido y estrategias basadas en ARN interferente pequeño. Varios estudios clínicos han evaluado la eficacia de tales terapias de silenciamiento génico que tienen como diana el gen apoB. Los efectos adversos de las terapias con ARNip y oligonucleótidos antisentido para reducir los lípidos incluyen reacciones en el lugar de la inyección, síntomas similares a los de la gripe y recuentos bajos de plaquetas

en sangre. Los efectos adversos quizás se resuelvan con generaciones más nuevas de estos fármacos que suministren los fármacos de manera más eficaz a las células hepáticas utilizando la conjugación con GalNAc, lo que reduciría los niveles del fármaco en el plasma. A pesar del suministro mejorado de los oligonucleótidos (tales como el ARNip) a la célula que se pueda conseguir mediante algunos de estos sistemas de suministro, el escape endosómico sigue siendo una barrera importante para la aplicación de terapias basadas en oligonucleótidos, tales como las terapias basadas en iARN. Solo una porción minúscula del oligonucleótido endocitado se escapa al espacio citoplásmico donde puede ejercer su función prevista, mientras que la gran mayoría permanece atrapado en los compartimentos endocíticos y es inactivo. La bibliografía reciente sugiere una tasa de escape de ARNip pasivo < 0,01 % (Setten, Ryan L. *et al. Nature Reviews Drug Discovery* 18.0 (2019): 421-446). Además, se ha demostrado que la capacidad de las células para internalizar funcionalmente los oligonucleótidos con el fin de producir el efecto diana (p. ej., desactivación) parece ser independiente de la medida en que las células internalizan los oligonucleótidos en masa. Estas observaciones han llevado a la hipótesis de separar las vías de captación libre en “productivas” y “no productivas”, aunque los mecanismos moleculares que distinguen estas vías siguen siendo desconocidos (Setten, Ryan L., John J. Rossi y Si-ping Han. *Nature Reviews Drug Discovery* 18.0 (2019): 421-446).

En conjunto, sigue siendo muy necesario disponer de sistemas de suministro de oligonucleótidos mejorados que den como resultado una mayor potencia (p. ej., desactivación de la diana), menos toxicidad y/o menos efectos fuera de la diana, independientemente del mecanismo subyacente (mejor escape endosomal, mayor captación de la vía “productiva” u otro mecanismo). Las saponinas se han descrito como potenciadores del escape endosómico de fármacos dirigidos (HENDRIK FUCHS *ET AL*: “Glycosylated Triterpenoids as Endosomal Escape Enhancers in Targeted Tumor Therapies”, BIOMEDICINES, vol. 5, no. 2, 29 de marzo de 2017 (2017-03-29), página 14). Los triterpenoides se utilizaron en combinación con conjugados de toxinas de anticuerpos, lo que dio como resultado una mejora de la eficacia antitumoral de los conjugados.

Una estrategia emergente implica la conjugación de oligonucleótidos antisentido (ASO, por sus siglas en inglés) con ligandos de receptores con el fin de aumentar la potencia y la distribución de los oligonucleótidos en tejidos seleccionados. Por ejemplo, la conjugación de N-acetilgalactosamina triantenaria (GalNAc) con agentes terapéuticos oligonucleotídicos produce una potencia de 10 a 30 veces mayor en hepatocitos aislados, así como en el hígado *in vivo*. GalNAc se encuentra en glucoproteínas dañadas que han perdido residuos terminales de ácido siálico de sus oligosacáridos colgantes. El hígado funciona eliminando estas proteínas de la circulación sistémica mediante la expresión de receptores triméricos de asialoglucoproteína (ASGPR) a niveles muy altos (del orden de 10^5 – 10^6 por célula) en la superficie de los hepatocitos. Los ASGPR se unen específicamente a GalNAc a pH neutro para la endocitosis de macromoléculas circulantes de la sangre y liberan GalNAc a pH ácido (~5–6) para la entrega de la carga en el endosoma temprano. A continuación, los ASGPR liberados se reciclan de nuevo a la superficie celular para su reutilización. Aproximadamente un tercio de los fármacos de iARN que se encuentran actualmente en ensayos clínicos son activadores de iARN modificados químicamente de una sola molécula conjugados con ligandos GalNAc multivalentes que tienen como diana los ASGPR. La fisiología adecuada del hígado, las propiedades únicas de los ASGPR, la naturaleza atóxica del ligando GalNAc y la simplicidad de los conjugados de GalNAc-ARNip hacen que esta sea una estrategia atractiva para el suministro sistémico de iARN a los hepatocitos.

Sin embargo, sigue siendo necesario disponer de sistemas de suministro mejorados que aumenten aún más la potencia, disminuyan la toxicidad y/o reduzcan los efectos fuera de la diana de los sistemas de oligonucleótidos que tienen como diana ASGPR (p. ej., conjugados de GalNAc-oligonucleótido).

RESUMEN

Un primer aspecto de la invención se refiere a un conjugado de saponina que comprende al menos una saponina unida covalentemente a un ligando para el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), donde el ligando para ASGPR comprende al menos un resto de N-acetilgalactosamina (GalNAc), preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, donde la al menos una saponina se selecciona entre saponinas triterpenoides monodesmosídicas y saponinas triterpenoides bidesmosídicas.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende:

- una primera composición farmacéutica que comprende el conjugado de saponina de la invención y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable; y
- una segunda composición farmacéutica que comprende un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR, donde el ligando para ASGPR comprende preferentemente al menos un resto de GalNAc, preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o

consiste en (GalNAc)₃Tris, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- el conjugado de saponina de la invención;
 - un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR, donde el ligando para ASGPR comprende preferentemente al menos un resto de GalNAc, preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc,
- 10 más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

15 Un cuarto aspecto de la invención se refiere a una combinación farmacéutica de la invención o composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento.

Un quinto aspecto de la invención se refiere a una combinación farmacéutica de la invención o composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o problema de salud en el que interviene un producto de expresión de uno cualquiera o más de los genes: apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, gen X del VHB, gen S del VHB, AAT y LDH

20

Un sexto aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para transferir el segundo conjugado o el tercer conjugado de la invención desde el exterior de una célula hacia el interior de dicha célula, preferentemente transfiriendo posteriormente la molécula efectora comprendida en el segundo conjugado o el tercer conjugado de la invención al citosol de dicha célula, que comprende los pasos de:

25

- a) proporcionar una célula que exprese ASGPR en su superficie y donde el tercer conjugado se ha de transferir a la célula, la cual expresa la molécula de la superficie celular para la cual el tercer conjugado comprende una molécula de unión para unirse a dicha molécula de la superficie celular, seleccionándose la célula preferentemente entre una célula hepática, una célula infectada por un virus y una célula tumoral;
 - b) proporcionar el segundo conjugado o el tercer conjugado de uno cualquiera de la invención para transferirlo a la célula proporcionada en el paso a);
 - c) proporcionar el conjugado de saponina de la invención;
 - d) poner en contacto la célula del paso a) *in vitro* o *ex vivo* con el segundo conjugado o el tercer conjugado del paso b) y el conjugado de saponina del paso c), con lo que se efectúa la transferencia del segundo conjugado o el tercer conjugado desde el exterior de la célula hacia el interior dicha célula, y preferentemente con lo que se efectúa posteriormente la transferencia del segundo conjugado o el tercer conjugado al citosol de dicha célula, o preferentemente con lo que se efectúa posteriormente la transferencia de al menos la molécula efectora comprendida en el segundo conjugado o el tercer conjugado al citosol de dicha célula.
- 30
- 35
- 40

DEFINICIONES

El término "GalNAc" tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a la N-acetilgalactosamina y al nombre de la IUPAC de esta: 2-(acetilamino)-2-desoxi-D-galactosa.

45

El término "(GalNAc)₃Tris" tiene su significado científico habitual, por ejemplo, en el campo de la terapia basada en ARNip, y se refiere en la presente a un resto que comprende tres unidades de GalNAc, cada una unida de forma covalente por separado a los grupos hidroxilo de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) (nombre de la IUPAC: 2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol), preferentemente a través de al menos un conector. (GalNAc)₃Tris puede existir como una molécula que comprende una amina libre o puede funcionalizarse adicionalmente a través del sitio de unión de la amina restante, por ejemplo, para formar los conjugados que comprenden (GalNAc)₃Tris-resto descritos en la presente.

50

El término "oligonucleótido" tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a una hebra de dos o más nucleótidos, es decir, un oligonucleótido es un oligómero corto compuesto de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos. Son ejemplos el ARN y el ADN, y cualquier ARN o ADN modificado, tal como una hebra de ácidos nucleicos que comprende un análogo nucleotídico, tal como un ácido nucleico con puente (BNA, por sus siglas en inglés), también conocido como ácido nucleico bloqueado (LNA, por sus siglas en inglés) o un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C-aminoetileno o 2'-O,4'-C-aminometileno (BNA^{NC}), donde el nucleótido es un ribonucleótido o un desoxirribonucleótido.

55

60

La expresión “actuación sobre un gen diana mediada por iARN” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a la estrategia *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* de ejercer una influencia sobre el funcionamiento del gen en una célula transfiriendo a dicha célula un oligonucleótido, tal como una molécula de ARN bicatenario pequeño, que tenga como diana el ARNm involucrado en la transcripción del gen: por ejemplo, las moléculas de ARN bicatenario pequeño son capaces de activar de forma eficaz el silenciamiento por iARN de genes específicos.

La expresión “ácido nucleico con puente”, o “BNA” en forma abreviada, o “ácido nucleico bloqueado” o “LNA” en forma abreviada tiene su significado científico normal y se refiere en el presente documento a un nucleótido de ARN modificado. También se hace referencia a un BNA como una “molécula de ARN restringida” o “molécula de ARN inaccesible”. Un monómero de BNA puede contener una estructura de puente de cinco miembros, seis miembros o incluso siete miembros con un plegamiento del azúcar C₃'-endo “fijo”. El puente se incorpora sintéticamente en la posición 2', 4' de la ribosa para proporcionar un monómero 2', 4'-BNA. Se puede incorporar un monómero de BNA en una estructura polimérica de oligonucleótido utilizando la química estándar de fosforamiditos conocida en la técnica. Un BNA es un oligonucleótido estructuralmente rígido con mayor afinidad de unión y estabilidad.

La expresión “oligonucleótido antisentido” tiene su significado científico habitual y puede indicarse en forma abreviada en la descripción como “AON” o “ASO” (por sus siglas en inglés).

La expresión “oligonucleótido antisentido basado en BNA”, o de forma abreviada “BNA-AON” (por sus siglas en inglés), tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a una hebra de nucleótidos antisentido donde al menos uno de dichos nucleótidos es un BNA.

El término “proteínaceo” tiene su significado científico habitual y se refiere en el presente documento a una molécula que es similar a una proteína, lo que significa que la molécula posee, hasta cierto punto, las propiedades fisicoquímicas características de una proteína, que es de una proteína, se relaciona con una proteína, contiene una proteína, pertenece a una proteína, consiste en una proteína, se parece a una proteína o es una proteína. El término “proteínaceo”, tal como se utiliza, por ejemplo, en “molécula protéínacea” se refiere a la presencia de al menos una parte de la molécula que se parece a una proteína o es una proteína, donde se debe entender que “proteína” incluye una cadena de residuos aminoacídicos de al menos dos residuos de longitud, con lo que se incluye así un péptido, un polipéptido y una proteína, y un conjunto de proteínas o dominios de proteínas. En la molécula protéínacea, los al menos dos residuos aminoacídicos están unidos, por ejemplo, a través de (un) enlace(s) de tipo amida, tal(es) como (un) enlace(s) peptídico(s). En la molécula protéínacea, los residuos aminoacídicos son residuos aminoacídicos naturales y/o residuos aminoacídicos artificiales tales como residuos aminoacídicos naturales modificados. En una realización preferida, una molécula protéínacea es una molécula que comprende al menos dos residuos aminoacídicos, preferentemente entre dos y aproximadamente 2000 residuos aminoacídicos. En una realización, una molécula protéínacea es una molécula que comprende de 2 a 20 (habitual para un péptido) aminoácidos. En una realización, una molécula protéínacea es una molécula que comprende de 21 a 1000 (habitual para un polipéptido, una proteína, un dominio de proteína, tal como un anticuerpo, un Fab, un scFv, un ligando para un receptor tal como EGF) aminoácidos. Preferentemente, los residuos aminoacídicos están unidos (habitualmente) a través de (un) enlace(s) peptídico(s). De acuerdo con la invención, dichos residuos aminoacídicos son o comprenden residuos aminoacídicos (modificados) (no) naturales.

La expresión “molécula efectora” o “resto efector” cuando se refiere a la molécula efectora como parte de, p. ej., un conjugado covalente, tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a una molécula que puede unirse selectivamente a, por ejemplo, una cualquiera o más de las moléculas diana: una proteína, un péptido, un carbohidrato, un sacárido tal como un glicano, un (fosfo)lípidio, un ácido nucleico tal como ADN, ARN, una enzima, y regula la actividad biológica de dicha una o más moléculas diana. La molécula efectora es, por ejemplo, una molécula seleccionada entre una cualquiera o más de una molécula de bajo peso molecular tal como una molécula de fármaco, una toxina tal como una toxina proteica, un oligonucleótido tal como un BNA, un ácido xenonucleico o un ARNip, una enzima, un péptido, una proteína o cualquier combinación de estos. De este modo, por ejemplo, una molécula efectora o un resto efector es una molécula o un resto seleccionado entre uno o más cualesquiera de una molécula de bajo peso molecular tal como una molécula farmacológica, una toxina tal como una toxina proteica, un oligonucleótido tal como un BNA, un ácido xenonucleico o un ARNip, una enzima, un péptido, una proteína o cualquier combinación de estos, que puede unirse selectivamente a una o más cualesquiera de las moléculas diana: una proteína, un péptido, un carbohidrato, un sacárido tal como un glicano, un (fosfo)lípidio, un ácido nucleico tal como ADN, ARN, una enzima, y que al unirse a la molécula diana regula la actividad biológica de dicha una o más moléculas diana. Habitualmente, una molécula efectora puede ejercer un efecto biológico dentro de una célula tal como una célula de mamífero tal como una célula humana, tal como en el citosol de dicha célula. Las moléculas efectoras habituales son, por lo tanto, moléculas de fármaco, ADN plasmídico, toxinas tales como toxinas comprendidas en conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC, por sus siglas en inglés), oligonucleótidos tales como

ARNip, BNA, ácidos nucleicos comprendidos en un conjugado de anticuerpo-oligonucleótido (AOC, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, una molécula efectora es una molécula que puede actuar como un ligando que puede aumentar o disminuir la actividad enzimática (intracelular), la expresión génica o la señalización celular.

La expresión “problema de salud” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a cualquier condición del cuerpo de un sujeto tal como un paciente humano, o de una parte, órgano, músculo, vena, arteria, piel, extremidad, sangre, célula, etc. de este, que es subóptima en comparación con la condición de ese cuerpo o parte de este en un sujeto sano, lo que dificulta el funcionamiento adecuado y/o el bienestar del sujeto, p. ej., dificulta el funcionamiento normal del cuerpo humano.

La expresión “fármaco oligonucleotídico decorado con GalNAc” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a un oligonucleótido para interferir en la transcripción de un gen, donde una o más unidades de GalNAc se acoplan al oligonucleótido, p. ej., a través de al menos un conector.

La expresión “ácido nucleico bloqueado”, de forma abreviada “LNA”, tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a un oligonucleótido que contiene una o más unidades estructurales nucleotídicas en las que un puente de metileno adicional fija el resto de ribosa o bien en la conformación C3'-endo (beta-D-LNA) o en la conformación C2'-endo (alfa-L-LNA), como se sabe en la técnica.

La expresión “ácido nucleico con puente NC”, de forma abreviada “BNA^{NC}” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a un oligonucleótido que contiene una o más unidades estructurales nucleotídicas que comprenden un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-C- aminoetileno adicional, con diferentes sustituciones en el átomo de N (de las cuales la utilizada más habitualmente hasta la fecha es un grupo metilo), como se sabe en la técnica.

La expresión “ARNip modificado químicamente y metabólicamente estable” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a una molécula de ARNip que comprende modificaciones químicas en comparación con el oligonucleótido de ARN que consiste en nucleótidos de origen natural, de modo que la molécula de ARNip modificada es más resistente a la degradación metabólica, digestión, lisis enzimática, etc., es decir, es más estable.

El término “saponina” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a un grupo de glucósidos anfipáticos que comprenden uno o más restos de glucona hidrófila combinados con un núcleo de aglucona lipófila que es una sapogenina. La saponina puede ser de origen natural o sintética (es decir, de origen no natural). El término “saponina” incluye saponinas de origen natural, derivados de saponinas de origen natural, así como saponinas sintetizadas *de novo* a través de rutas de síntesis químicas y/o biotecnológicas.

La expresión “derivado de saponina” (que también se conoce como “saponina modificada”) tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a un compuesto que corresponde a una saponina de origen natural que ha sido derivatizada mediante una o más modificaciones químicas tales como la oxidación de un grupo funcional, la reducción de un grupo funcional y/o la formación de un enlace covalente con otra molécula. Las modificaciones preferidas incluyen la derivatización de un grupo aldehído del núcleo de aglucona; de un grupo carboxilo de una cadena de sacárido o de un grupo acetoxi de una cadena de sacárido. Por lo general, el derivado de saponina no tiene un homólogo natural, es decir, el derivado de saponina no es producido de forma natural por, p. ej., plantas o árboles. La expresión “derivado de saponina” incluye derivados obtenidos mediante la derivatización de saponinas de origen natural, así como derivados sintetizados *de novo* a través de rutas de síntesis químicas y/o biotecnológicas que dan como resultado un compuesto correspondiente a una saponina de origen natural que ha sido derivatizada mediante una o más modificaciones químicas.

La expresión “estructura del núcleo de aglucona” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente al núcleo de aglucona de una saponina sin la una o dos antenas de carbohidratos o cadenas de sacáridos (glucanos) unidas a él. Por ejemplo, el ácido quillaico es la estructura del núcleo del glucósido de aglucona para SO1861, QS-7, QS-21.

La expresión “cadena de sacárido” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a cualquiera de entre un glucano, una antena de carbohidratos, un único resto de sacárido (monosacárido) o una cadena que comprende múltiples restos de sacárido (oligosacárido, polisacárido). La cadena de sacárido puede consistir únicamente en restos sacarídicos o puede comprender también otros restos tales como uno cualquiera de entre el ácido 4E-metoxicinámico, ácido 4Z-metoxicinámico y ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metiloctanoil]-3,5-dihidroxi-6-metiloctanoico, tal como, por ejemplo, el presente en QS-21.

El término “Api/Xyl-” o “Api- o Xyl-” en el contexto del nombre de una cadena de sacárido tiene su significado científico habitual y se refiere en el presente documento a la cadena de sacárido que o bien comprende un resto de apiosa (Api) o comprende un resto de xilosa (Xyl).

La expresión “conjugado de anticuerpo-fármaco” o “ADC” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a cualquier conjugado de un anticuerpo tal como una IgG, un Fab, un scFv, una inmunoglobulina, un fragmento de inmunoglobulina, uno o múltiples dominios Vh, etc., y cualquier molécula que pueda ejercer un efecto terapéutico cuando entra en contacto con las células de un sujeto tal como un paciente humano, tal como un principio farmacéutico activo, una toxina, un oligonucleótido, una enzima, un compuesto farmacológico que sea una molécula de bajo peso molecular, etc.

La expresión “conjugado de anticuerpo-oligonucleótido” o “AOC” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a cualquier conjugado de un anticuerpo tal como una IgG, un Fab, un scFv, una inmunoglobulina, un fragmento de inmunoglobulina, uno o múltiples dominios Vh, etc., con cualquier molécula de oligonucleótido que pueda ejercer un efecto terapéutico cuando entra en contacto con las células de un sujeto tal como un paciente humano, tal como un oligonucleótido seleccionado entre una hebra natural o sintética de ácidos nucleicos que engloban ADN, ADN modificado, ARN, ARN modificado, ácidos nucleicos sintéticos, que se presenta como una molécula monocatenaria o una molécula bicatenaria, tal como un BNA, un oligonucleótido específico de alelo, un ARN interferente pequeño o corto (ARNip; ARN silenciador), un ADN antisentido, ARN antisentido, etc.

El término “conjugado” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a al menos una primera molécula que está unida covalentemente a al menos una segunda molécula, con lo que forman de este modo un ensamblaje acoplado covalentemente que comprende o consiste en la primera molécula y la segunda molécula. Los conjugados habituales son tris(GalNAc)₃ – ARNip, un ADC, un AOC y SO1861-EMCH (EMCH unido al grupo aldehído de la estructura del núcleo del glucósido de aglucona de la saponina).

El término “resto” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a una molécula que está unida, conectada, conjugada a otra molécula, conector, ensamblaje de moléculas, etc., con lo que forma parte de este modo de una molécula, conjugado, ensamblaje de moléculas más grande. Habitualmente, un resto es una primera molécula que está unida covalentemente a una segunda molécula, involucrando uno o más grupos químicos inicialmente presentes en la primera y segunda molécula. Por ejemplo, la saporina es una molécula efectora habitual. Como parte de un conjugado de anticuerpo-fármaco, la saporina es un resto efector habitual en el ADC. Como parte de un conjugado de anticuerpo-oligonucleótido, un BNA o un ARNip es un resto efector habitual en el AOC.

El término “S”, tal como se utiliza, por ejemplo, en un conjugado o constructo de anticuerpo-saponina que comprende un conector, representa un “conector estable” que permanece intacto en el endosoma y en el citosol.

El término “L”, tal como se utiliza, por ejemplo, en un conjugado o constructo de anticuerpo-saponina que comprende un conector, representa un “conector lábil” que se escinde en condiciones ligeramente ácidas en el endosoma.

El término “resto” tiene su significado científico habitual y se refiere en la presente a una molécula que está unida, conectada, conjugada a otra molécula, conector, ensamblaje de moléculas, etc., con lo que forma parte de este modo de una molécula, conjugado, ensamblaje de moléculas más grande. Habitualmente, un resto es una primera molécula que está unida covalentemente a una segunda molécula, involucrando uno o más grupos químicos inicialmente presentes en la primera molécula y presentes en la segunda molécula. Por ejemplo, la saporina es una molécula habitual y es un ejemplo de una molécula efectora. Como parte de un conjugado de anticuerpo-fármaco, la saporina es un resto efector habitual en el ADC. Como parte de un conjugado de anticuerpo-oligonucleótido, un BNA o un ARNip es un resto efector habitual en el AOC.

El término “DAR” normalmente significa *Drug Antibody Ratio* (relación de fármaco y anticuerpo) y se refiere a la relación promedio del fármaco respecto al anticuerpo para un preparado determinado de conjugado de anticuerpo y fármaco (ADC) y se refiere en la presente a una relación de la cantidad de restos SO1861 unidos, o SPT001, respecto a la molécula conjugada.

Los términos primero, segundo, tercero y similares en la descripción y en las reivindicaciones se utilizan para distinguir, por ejemplo, entre elementos, composiciones, constituyentes similares en una composición, o pasos de métodos separados, y no necesariamente para describir un orden secuencial o cronológico. Los términos son intercambiables en circunstancias apropiadas y las realizaciones de la invención pueden operar en secuencias distintas a las descritas o ilustradas en el presente documento, a menos que se especifique otra cosa.

Las realizaciones de la invención descritas en el presente documento pueden operar en combinación y cooperación, a menos que se especifique otra cosa.

Además, las diversas realizaciones, aunque se haga referencia a ellas como “preferidas” o “p. ej.” o “por ejemplo” o “en particular” y similares, deben interpretarse como formas ilustrativas en las que la invención puede implementarse en lugar de como limitantes del alcance de la invención.

La expresión “que comprende”, utilizada en las reivindicaciones, no debe interpretarse como restringida a, por ejemplo, los elementos o los pasos del método o los constituyentes de la composición enumerada a continuación; no excluye otros elementos o pasos del método o constituyentes en una composición determinada. Debe interpretarse como que especifica la presencia de las características, elementos integrantes, pasos (del método) o componentes indicados a los que se hace referencia, pero no excluye la presencia o adición de una o más características, elementos integrantes, pasos o componentes distintos, o grupos de estos. Por lo tanto, el alcance de la expresión “un método que comprende los pasos A y B” no debe limitarse a un método que consiste solo en los pasos A y B, sino que, con respecto a la presente invención, los únicos pasos enumerados del método son A y B, y además, se debe interpretar que la reivindicación incluye equivalentes de estos pasos del método. Por lo tanto, el alcance de la expresión “una composición que comprende los componentes A y B” no debe limitarse a una composición que consiste solo en los componentes A y B, sino que, con respecto a la presente invención, los únicos componentes enumerados de la composición son A y B, y además, se debe interpretar que la reivindicación incluye equivalentes de estos componentes.

Además, la referencia a un elemento o componente mediante el artículo indefinido “un” o “uno/a” no excluye la posibilidad de que esté presente más de uno de los elementos o componentes, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo uno de los elementos o componentes. Por lo tanto, el artículo indefinido “un” o “uno/a” significa generalmente “al menos uno/a”.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: síntesis de GalNAc trivalente.

Figura 2: síntesis de SO1861-DBCO.

Figura 3: síntesis de GalNAc monovalente-SO1861.

Figura 4: síntesis de GalNAc trivalente-SO1861.

Figura 5: síntesis de GalNAc monovalente-BNA.

Figura 6: síntesis de GalNAc trivalente-BNA.

Figura 7: síntesis de GalNAc trivalente-BNA.

Figura 8A y 8B: síntesis de GalNAc trivalente.

Figura 9A y 9B: toxicidad general (MTS) de GalNAc-SO1861 y GalNAc trivalente-SO1861 en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 9B también se aplica a la Figura 9A.

Figura 10A y 10B: Ensayo de muerte celular (MTS) en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 10B también se aplica a la Figura 10A.

Figura 11A y 11B: Análisis de la expresión génica en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B).

Figura 12A y 12B: Análisis de la expresión génica en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 12B también se aplica a la Figura 12A.

Figura 13A y 13B: Ensayo de viabilidad celular en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 13B también se aplica a la Figura 13A.

Figura 14A y 14B: Análisis de la expresión génica en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 14B también se aplica a la Figura 14A.

Figura 15A y 15B: Ensayo de viabilidad celular en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 15B también se aplica a la Figura 15A.

Figura 16A y 16B: Análisis de la expresión génica en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 16B también se aplica a la Figura 16A.

Figura 17A y 17B: Análisis de la expresión génica en líneas celulares HepG2 (A) y Huh7 (B). La leyenda que se muestra junto a la Figura 17B también se aplica a la Figura 17A.

Figura 18: Análisis de la expresión de ARN de *ApoB* en hepatocitos primarios de ratón.

Figura 19: Análisis de la expresión de ARN de *ApoB* en tejido hepático de ratones C57BL/6J.

Figura 20: Análisis de la proteína *ApoB* en suero en ratones C57BL/6J. Nota: no se indican los valores del análisis para los grupos de 1 mg/kg de ApoB#02 y 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#03 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO861 a las 336 horas.

Figura 21: Análisis de colesterol LDL (LDL-C) en suero para ratones C57BL/6J.

Figura 22: Análisis de ALT en suero para ratones C57BL/6J.

Figura 23: Ensayo de viabilidad celular (CTG) en hepatocitos primarios humanos.

Figura 24: Análisis de la expresión de ARN de ApoB y ensayo de viabilidad celular en hepatocitos primarios humanos.

Figura 25: Síntesis de (GalNAc)₃-Ls-SO1861, intermedio 22, 23.

Figura 26: Síntesis de (GalNAc)₃-Ls-SO1861, intermedio 24.

Figura 27: Síntesis de (GalNAc)₃-Ls-BNA, intermedio 25, 26.

Figura 28: Síntesis de (GalNAc)₃-Ls-BNA.

Figura 29A: Viabilidad celular relativa de hepatocitos primarios humanos (en comparación con células no tratadas, "sin tratar", que se establece en un 100 %) al poner en contacto las células con una serie de concentraciones de GalNAc trivalente conjugada con SO1861 ((GN)₃-SPT), la combinación de anticuerpo monoclonal anti-CD71 conjugado con saporina (CD71-SPRN) 10 pM y una serie de concentraciones de SO1861 con EMCH unido al grupo aldehído de la aglucona (SPT-EMCH), la combinación de CD71-SPRN 10 pM y una serie de concentraciones de (GN)₃-SPT, y la combinación de CD71-SPRN 10 pM y una serie de concentraciones de (GN)₃ conjugada con un dendrón con cuatro restos de SO1861 unidos covalentemente a este (DAR = 4 para el SO1861 unido) ((GN)₃-dSPT4).

Figura 29B: Expresión relativa del gen ApoB de hepatocitos primarios humanos (en comparación con células no tratadas, "sin tratar", que se establece en un 100 %) al poner en contacto las células con una serie de concentraciones de GalNAc trivalente conjugada con un oligonucleótido antisentido para silenciar el ARNm de ApoB y la expresión de la proteína ApoB ((GalNAc)₃-ApoB), la combinación de GalNAc trivalente 300 nM conjugada con SO1861 ((GalNAc)₃-SPT001) y una serie de concentraciones de (GalNAc)₃-ApoB. "Sin tratar" son células no tratadas, en las que se establece que la expresión de ApoB es de un 100 %.

Figura 30A y 30B: Viabilidad celular de hepatocitos primarios humanos (A) y células de la línea celular de hepatocitos Huh7 (B) (ambas en comparación con células no tratadas, "sin tratar", que se establece en un 100 %), al poner en contacto las células con una serie de concentraciones de GalNAc trivalente conjugada con SO1861 (GalNAc trivalente-SPT001), la combinación de anticuerpo monoclonal anti-CD71 conjugado con saporina (CD71-saporina) 10 pM y una serie de concentraciones de conjugado covalente de GalNAc trivalente-SPT001.

Figura 30C: Representación gráfica del conjugado covalente de GalNAc trivalente-SPT001 (DAR = 1 para SO1861). "S" es SPT001, SO1861 en la representación gráfica.

Figura 30D: Representación gráfica del conjugado de anticuerpo anti-CD71 - saporina (OKT-9), donde "T" es la toxina saporina unida covalentemente a la cadena pesada del anticuerpo.

Figura 31A y B: Expresión relativa del gen ApoB de hepatocitos primarios humanos (A) y células de la línea celular de hepatocitos Huh7 (B), al poner en contacto las células con una serie de concentraciones de GalNAc trivalente conjugada con un oligonucleótido antisentido para silenciar el ARNm de ApoB y la expresión de la proteína ApoB (GalNAc trivalente-BNA de ApoB), la combinación de GalNAc trivalente conjugada con SO1861 (GalNAc trivalente-SPT001) 300 nM (DAR = 1 con respecto al SPT001 unido (SO1861)) y una serie de concentraciones de GalNAc trivalente-BNA de ApoB.

Figura 31C: Representación gráfica del conjugado covalente de GalNAc trivalente-BNA de ApoB. "A" es el oligonucleótido antisentido de ApoB (BNA de ApoB) en la representación gráfica.

Figura 32A y B: Expresión absoluta de la proteína ApoB por parte de hepatocitos primarios humanos (A) y células de la línea celular de hepatocitos Huh7 (B), bajo la influencia del contacto de las células con una serie de concentraciones de GalNAc trivalente-BNA de ApoB, la combinación de GalNAc trivalente-SPT001 300 nM y una serie de concentraciones de GalNAc trivalente-BNA de ApoB.

Figura 33A: Síntesis del dendrón (SPT001)₄-NH₂ (molécula 15 a partir de las moléculas 13 y 14).

Figura 33B: Síntesis del dendrón (SPT001)₄-azida (molécula 19 a partir de las moléculas 15 y 18).

Figura 33C: Síntesis del dendrón (SPT001)₄-GalNAc trivalente (molécula 24 a partir de las moléculas 19 y 23).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se describirá con respecto a realizaciones particulares, pero la invención no está limitada por ellas sino únicamente por las reivindicaciones.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un conjugado de saponina que comprende al menos una saponina unida covalentemente a un ligando para el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), donde el ligando para ASGPR comprende al menos un resto de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, donde la al menos una saponina se selecciona entre saponinas triterpenoides monodesmosídicas y saponinas triterpenoides bidesmosídicas.

Las saponinas del tipo glucósido triterpénico tienen la capacidad de estimular el suministro de moléculas efectoras desde el exterior de una célula diana hacia el interior de dicha célula y, posteriormente, al citosol de dicha célula. Las saponinas facilitan, por ejemplo, la captación mediada por receptores de ciertas moléculas efectoras, tales como una

toxina proteica comprendida en un ADC. La endocitosis de la toxina, como parte del ADC, libera la toxina en el endosoma y/o en el lisosoma de la célula diana. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, la liberación posterior del ADC, o al menos de la toxina, fuera del endosoma o lisosoma y dentro del citosol celular, es estimulada o mediada por la saponina triterpenoide. Cuando una célula diana entra en contacto con la toxina a una dosis de toxina que es demasiado baja para ejercer un efecto intracelular, la coadministración de la toxina, tal como formando parte de un ADC, y una saponina libre, de modo que la célula diana entre en contacto con tanto el ADC como la saponina, puede dar como resultado una destrucción eficaz de la célula diana mediada por la toxina, con la misma dosis de toxina que es ineficaz cuando se pone en contacto con la célula diana en ausencia de la saponina. Por lo tanto, bajo la influencia de la saponina, se mejora la ventana terapéutica de la toxina. Aun así, la dosis de toxina requerida para la destrucción eficaz y suficiente de las células diana puede ir acompañada de efectos no deseados fuera de la diana, por ejemplo, cuando el receptor de la célula tumoral que es la diana del ADC no es realmente un receptor específico de la célula tumoral, sino que también se expresa en cierto grado más bajo en la superficie de, p. ej., células sanas, en otra parte del cuerpo de un paciente, o en células que están presentes en el mismo órgano donde residen las células diana. Además, la dosis requerida de saponina libre, necesaria para alcanzar un grado suficiente de activación de la toxina (suministro de la toxina en el citosol de la célula diana), puede ser de un nivel tal que el riesgo de efectos secundarios mediados por la saponina sea evidente. Dado que la saponina se administra por vía sistémica y no dirigida cuando se considera la célula diana (tumoral) que se ha de tratar con la toxina, se debe administrar una dosis de saponina relativamente alta al paciente que necesita el tratamiento con la toxina, para alcanzar la dosis local de saponina al nivel de las células diana.

Los inventores han descubierto ahora sorprendentemente que la dosis de saponina requerida para potenciar el efecto de una toxina en las células tumorales, puede reducirse en un factor de aproximadamente 100 a 1000, cuando la saponina se proporciona con un resto de direccionamiento hacia la célula diana, tal como el ligando de un receptor (p. ej., EGF o una citocina), un anticuerpo o un fragmento de unión o dominio de este. Para las células tumorales, hoy en día existe constancia de que una serie de receptores de la superficie celular tienen una expresión específica en la superficie de tales células anómalas. Los inventores han acoplado con éxito saponinas a anticuerpos y ligandos para la unión a receptores específicos de células tumorales tales como el anticuerpo anti-CD71 OKT-9, trastuzumab, cetuximab, etc. Tales conjugados de saponina dirigidos son capaces en efecto de estimular, p. ej., el efecto citotóxico de una toxina dentro de una célula diana, aunque a una dosis de saponina de 100 a 1000 veces menor en comparación con la dosis requerida para la misma saponina en forma libre, no provista de una molécula de unión que tiene como diana la célula tumoral. Los presentes inventores además han inventado que el suministro específico en las células diana y la posterior endocitosis de la saponina (dirigida) también es posible para células no anómalas o células anómalas no relacionadas con, p. ej., el cáncer (células tumorales), una enfermedad autoinmunitaria, células infectadas por virus, etc. Es decir, sorprendentemente, los inventores han descubierto que ASGPR proporciona una entrada adecuada en las células portadoras de este receptor, tales como las células hepáticas, para la entrada de saponinas provistas de un ligando para ASGPR, en particular ASGPR1. Ligandos conocidos tales como GalNAc monovalente y GalNAc trivalente se acoplan con éxito a una o una multitud (2, 4, 8, etc.) de moléculas de saponina, con lo que proporcionan conjugados de saponina que comprenden el ligando de ASGPR y que comprenden al menos un resto de saponina.

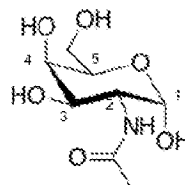
El contacto de células que expresan ASGPR, tales como las células hepáticas, con los conjugados de saponina que comprenden el ligando para ASGPR, da como resultado sorprendentemente la captación de la saponina, como se pone de manifiesto cuando tales células son la codiana de, p. ej., conjugados que comprenden un ácido nucleico silenciador de genes y una molécula de unión para una molécula de la superficie de la célula diana, p. ej., CD71, ASGPR, lo que da como resultado un silenciamiento del gen dependiente de la saponina en la célula diana, o conjugados que comprenden tal molécula de unión para la célula diana y una toxina, lo que da como resultado una citotoxicidad dependiente de la saponina. El hecho de proporcionar la saponina con un ligando para ASGPR da como resultado efectos en la célula diana, ejercidos por una molécula efectora coadministrada, tal como un oligonucleótido o toxina dirigido (p. ej., un anticuerpo anti-CD71 o ligando de ASGPR acoplado a un ácido nucleico o a una toxina). Tales efectos se ponen de manifiesto en un grado mucho menor, o incluso nulo, cuando las células diana se ponen en contacto únicamente con la molécula efectora, en ausencia de la saponina dirigida. Por lo tanto, los conjugados de saponina de la invención mejoran la eficacia terapéutica de las moléculas efectoras cuando se considera una célula diana que comprende ASGPR en su superficie, y tal célula diana se pone en contacto tanto con la saponina-ligando de ASGPR de la invención como con la molécula efectora (dirigida). De este modo, se mejora la ventana terapéutica de la molécula efectora: un mayor efecto terapéutico con la misma dosis, bajo la influencia de la coadministración del conjugado de saponina; o un efecto terapéutico similar con una dosis más baja, bajo la influencia de la coadministración del conjugado de saponina. Los inventores también han descubierto que se requiere una dosis de conjugado de saponina de aproximadamente 100 a 1000 veces menor para alcanzar un cierto nivel de efecto terapéutico en la célula que expresa ASGPR diana, tal como una célula hepática, inducido por la coadministración de una molécula efectora (dirigida) tal como un ASO, un ARNip, un BNA, una toxina tal como una

toxina proteica, en comparación con la dosis de saponina requerida para alcanzar el efecto similar, cuando la saponina no está provista de un ligando para ASGPR.

Por lo tanto, sorprendentemente, los inventores proporcionan ahora métodos terapéuticos mejorados que utilizan ASGPR como un receptor diana para el suministro mediado por la saponina de una molécula efectora en el citosol de células que expresan ASGPR, lo que da como resultado unos efectos terapéuticos similares inducidos por la molécula efectora con dosis más bajas que las posibles en ausencia del conjugado de saponina de la invención. Por lo tanto, la presente invención proporciona un uso terapéutico mejorado del efecto estimulador de las saponinas, cuando se considera el suministro de una molécula efectora al citosol de, p. ej., las células hepáticas, proporcionando el conjugado saponina - ligando de ASGPR de la invención. Las ventajas alcanzadas por los inventores son, entre otras: una dosis más baja requerida para la molécula efectora mediante la coadministración de la molécula efectora (dirigida) con saponina, y una dosis más baja requerida para la saponina al proporcionar la saponina como un conjugado covalente de un ligando para ASGPR, tal como GalNAc trivalente, y uno o más restos de saponina. Sorprendentemente, el ligando para ASGPR puede ser el mismo en el conjugado de saponina y en el conjugado de la molécula efectora dirigida, lo que da como resultado unos efectos mediados por la molécula efectora eficaces en la célula diana, bajo la influencia estimuladora de la saponina. Es decir, el conjugado de saponina y el conjugado de molécula efectora, que comprenden ambos ligandos unidos covalentemente para ASGPR, tales como GalNAc trivalente, pueden coadministrarse a células diana, tales como células hepáticas que exponen ASGPR en su superficie, de modo que el efecto terapéutico deseado de la molécula efectora se obtiene de forma eficaz, mientras que ambos conjugados tienen como diana el mismo receptor y utilizan la misma vía para la endocitosis en la célula. Este hallazgo sorprendente es muy beneficioso para terapias que tienen como diana las células hepáticas, tales como terapias que involucran el suministro citosólico de un ácido nucleico (ASO, BNA, ARNip, por mencionar algunos), ya que las células hepáticas expresan ASGPR, donde ASGPR es específico para las células hepáticas, mientras que otros receptores de las células hepáticas lo suficientemente específicos para su uso en la terapia que tiene como diana las células hepáticas están virtualmente ausentes. Por lo tanto, la presente invención abre nuevas vías para mejorar terapias dirigidas a las células hepáticas en las que las moléculas efectoras deben suministrarse intracelularmente y localizarse para su modo de acción. La saponina dirigida proporcionada como los conjugados de saponina de la invención amplía la ventana terapéutica de tales moléculas efectoras y, a la vez, al proporcionar la saponina con una molécula de unión que tiene como diana las células hepáticas, también se mejora la ventana terapéutica de la saponina, de acuerdo con la invención.

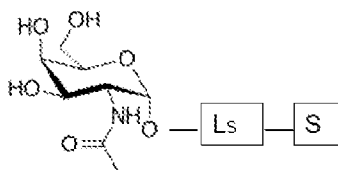
Conjugado de saponina – introducción

La presente invención proporciona un conjugado de una saponina y un ligando para el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), al que se hace referencia en la presente como “conjugado de saponina”. El ligando de ASGPR comprende al menos un resto de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). De acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, cada resto de GalNAc está unido a la parte remanente del ligando de ASGPR o, en el caso de que el ligando de ASGPR consista en un único resto de GalNAc, al resto de saponina, a través de un enlace covalente con el oxígeno en la posición “1” tal como se indica en la fórmula (I):



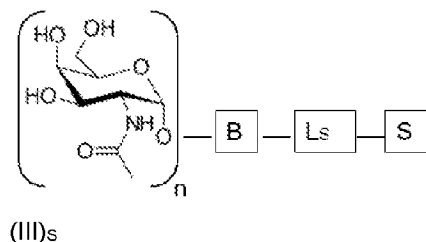
(I)

Tal como se muestra en la fórmula (II)_S, el ligando de ASGPR consiste en un único resto de GalNAc unido al resto de saponina S, preferentemente a través de un conector del resto de saponina L_S.

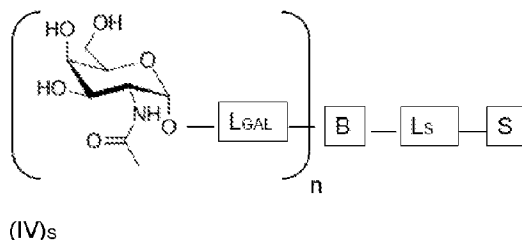


(II)_S

El ligando de ASGPR puede comprender más de un resto de GalNAc, tal como 2, 3, 4, 5 o 6 restos de GalNAc, preferentemente 3 o 4 restos de GalNAc. En tal caso, se prefiere que los restos de GalNAc estén unidos covalentemente cada uno por separado a través del oxígeno en la posición "1" a un resto que actúa como puente central B, el cual forma de hecho un puente entre los restos de GalNAc y el resto de saponina, preferentemente a través de un conector del resto de saponina L_S . Los restos de GalNAc pueden unirse directamente al resto que actúa como puente B tal como se muestra en la fórmula (III)_S:



donde n es un número entero superior o igual a 2, L_S es un conector del resto de saponina y S es el resto de saponina. Más preferentemente, los restos de GalNAc se unen al resto que actúa como puente B a través de conectores de GalNAc L_{GAL} tal como se muestra en la fórmula (IV)_S:

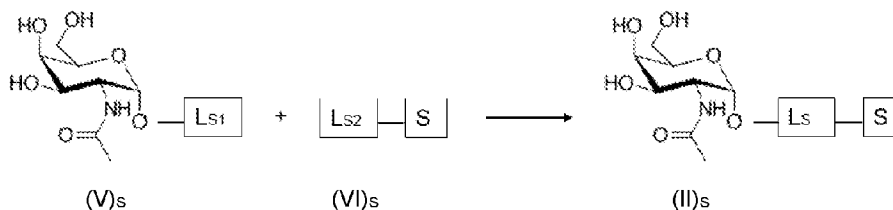


donde n es un número entero superior o igual a 2, L_S es un conector del resto de saponina y S es el resto de saponina. Si bien cada aparición de L_{GAL} se puede seleccionar independientemente, el experto apreciará que la síntesis del conjugado de saponina se simplifica en el caso de que cada aparición de L_{GAL} represente el mismo resto.

Conjugado de saponina - conector L_S

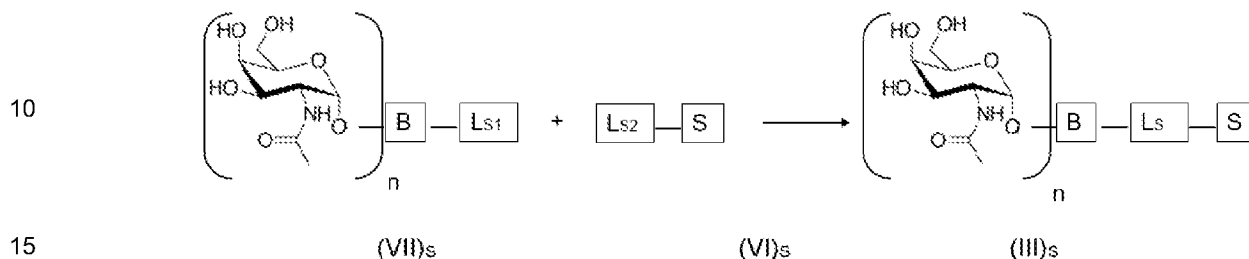
El conector del resto de saponina L_S representa cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente una saponina a GalNAc como en la fórmula (II)_S o al resto que actúa como puente B como en la fórmula (III)_S y (IV)_S. La identidad y el tamaño del conector no se ven limitados particularmente y la unión covalente de una saponina a GalNAc como en la fórmula (II)_S o al resto que actúa como puente B como en la fórmula (III)_S y (IV)_S se puede efectuar mediante un grupo funcional químico "habitual" (p. ej., un enlace de tipo éster), así como mediante conectores de tipo "química click", los cuales tienen habitualmente una longitud de la cadena larga, lo que da como resultado un conector E_S que comprende, p. ej., más de 10 o más de 20 átomos de carbono. Los conectores L_S adecuados y las reacciones de acoplamiento asociadas para unir las moléculas entre sí se describen en el manual Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013.

Como entenderá el experto, el conector del resto de saponina L_S será habitualmente el resultado de una reacción de acoplamiento (p. ej., de tipo "química click") entre al menos un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina. Este principio se ilustra en el siguiente esquema de reacción para el compuesto de fórmula (II)_S:



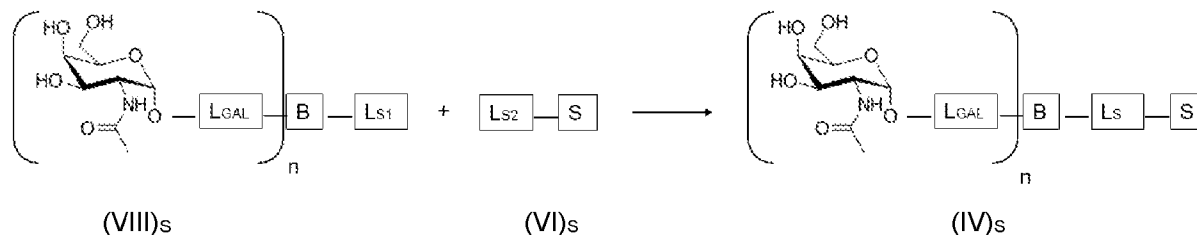
donde L_S es un conector del resto de saponina, L_{S1} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y L_{S2} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente al resto de saponina y S es el resto de saponina.

5 El esquema de reacción correspondiente para el compuesto de fórmula (III)_S es el siguiente:



donde L_S es un conector del resto de saponina, L_{S1} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente a GalNAc y L_{S2} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente al resto de saponina, n es un número entero superior o igual a 2, B es un resto que actúa como puente y S es el resto de saponina.

El esquema de reacción correspondiente para el compuesto de fórmula (IV)_S es el siguiente:



donde L_S es un conector del resto de saponina, L_{S1} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente a GalNAc y L_{S2} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente al resto de saponina, n es un número entero superior o igual a 2, B es un resto que actúa como puente, S es el resto de saponina y $LGAL$ es un conector de GalNAc.

El conector del resto de saponina L_S puede ser el resultado de una reacción de acoplamiento entre al menos un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, donde la reacción de acoplamiento es, por ejemplo, una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleófila de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido (tales como aziridinas, epóxidos, sulfatos cíclicos, iones de aziridinio, iones de episulfonio), una reacción de un carbonilo que no sea de tipo aldólica (tal como la formación de urea, tiourea, hidrazona, éter de oxima, amida o heterociclo aromático) o una adición a un doble enlace carbono-carbono (tal como una epoxidación, aziridinación, dihidroxilación, adición de haluro de sulfenilo, adición de haluro de nitrosilo o adición de Micheal), preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleófila de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido, más preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino o un acoplamiento de tiol y maleimida.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el conector del resto de saponina L_S comprende una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol, preferentemente una hidrazona y un 1,2,3-triazol. Siempre que se haga referencia a un 1,2,3-triazol en el contexto de los conectores de la presente solicitud, esto significa preferentemente un 1H-1,2,3-triazol.

Tal hidrazona es, p. ej., el resultado de un acoplamiento entre una hidrazida terminal y un compuesto que contiene un aldehído (tal como una saponina que contiene un aldehído). Este acoplamiento de hidrazida/aldehído es una herramienta conocida de química "click" en el campo de la bioconjugación y se describe, por ejemplo, en Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013.

Tal 1,2,3-triazol es, p. ej., el resultado de un acoplamiento entre una azida y un compuesto que contiene un alquino. Este acoplamiento de azida/alquino es una herramienta de química "click" conocida de forma generalizada en el campo de la bioconjugación y se describe, por ejemplo, en Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013.

Por consiguiente, se prefiere que el conector del resto de saponina L_S sea el resultado de una reacción de acoplamiento entre un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B, comprendiendo el primer precursor L_{S1} una azida; y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, comprendiendo el segundo precursor L_{S2} un alquino y comprendiendo preferentemente una hidrazona resultante de un acoplamiento de hidrazida/aldehído con un aldehído del resto de saponina.

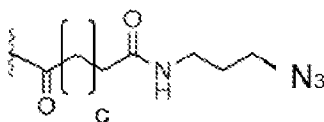
Las realizaciones de la estructura para el precursor L_{S1} presente en los compuestos de fórmula (V)_S son las siguientes azidas:



(XVII)

donde a representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente a representa un número entero seleccionado entre 1, 2 y 3, más preferentemente a representa 2.

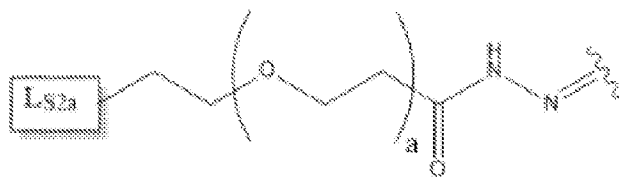
Las realizaciones de la estructura para el precursor L_{S1} presente en los compuestos de fórmula (VII)_S o (VIII)_S son las siguientes azidas:



(XVIII)

donde c representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente c representa un número entero en el intervalo de 5-15, más preferentemente c representa 9.

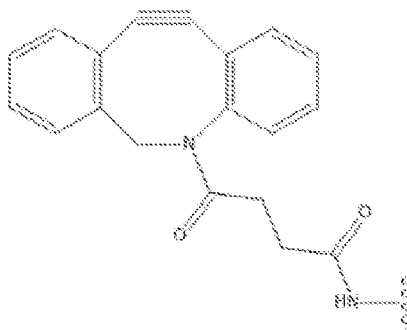
Las realizaciones de la estructura para el precursor L_{S2} presente en los compuestos de fórmula (VI)_S son las siguientes hidrazonas:



(XIX)

donde a representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente a representa un número entero en el intervalo de 2-6, más preferentemente a representa 4, y donde L_{S2a} representa un resto que contiene un alquino. Como entenderá el experto teniendo en cuenta la presente divulgación, la hidrazona representada en la fórmula (XIX) es el resultado de una reacción de una hidrazida con un aldehído del resto de saponina.

L_{S2a} comprende preferentemente menos de 20 átomos de carbono, más preferentemente L_{S2a} representa un resto de acuerdo con la fórmula (XX):



(XX)

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el conjugado de saponina es un compuesto de fórmula (II)_S, (III)_S o (IV)_S tal como se describe en la presente, donde el conector del resto de saponina L_S es el resultado de una reacción de acoplamiento entre un compuesto de fórmula (V)_S, (VII)_S o (VIII)_S con un compuesto de fórmula (VI)_S, donde el primer precursor L_{S1} es una azida, por ejemplo, una azida de fórmula (XVII) o fórmula (XVIII), y donde el segundo precursor L_{S2} es un compuesto de fórmula (XIX) que comprende un resto que contiene un alquino L_{S2a}, por ejemplo, el alquino de fórmula (XX) y una hidrazona resultante de una reacción de una hidrazida con un aldehído del resto de saponina.

Conjugado de saponina - saponina

Un aspecto de la invención se refiere a un conjugado de saponina que comprende al menos una saponina unida covalentemente a un ligando para el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), donde el ligando para ASGPR comprende al menos un resto de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, donde al menos una saponina se selecciona entre saponinas triterpenoides monodesmosídicas y saponinas triterpenoides bidesmosídicas.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona seleccionada del grupo que consiste en:

ácido 2alfa-hidroxioleanólico;
 ácido 16alfa-hidroxioleanólico;
 hederagenina (ácido 23-hidroxioleanólico);
 ácido 16alfa,23-dihidroxioleanólico;
 gipsogenina;
 ácido quillaico;
 21(2-metilbut-2-enoato) y 22-acetato de protoascigenina;
 C-21,22-bis(2-metilbut-2-enoato) de 23-oxobarringtonenol;
 C-21(2-metilbut-2-enoato) y 16,22-diacetato de 23-oxo-barringtonenol;
 digitogenina;
 3,16,28-trihidroxioleanan-12-eno;
 ácido gipsogénico,
 y
 derivados de estos,

preferentemente la saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona seleccionada entre ácido quillaico y gipsogenina o derivados de estos, más preferentemente la estructura del núcleo de aglucona de la saponina es ácido quillaico o un derivado de este. Tales agluconas preferidas comprenden un grupo aldehído en el átomo C-23 o un derivado de este tal como se describe en otras partes de la presente. Sin pretender vincularse a ninguna teoría, tal grupo aldehído contribuye a la actividad potenciadora del escape endosomal de las saponinas del tipo glucósido triterpénico, que comprenden una aglucona seleccionada del Grupo C, especialmente ácido quillaico y gipsogenina.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la al menos una saponina es una saponina triterpénica monodesmosídica o bidesmosídica que pertenece al tipo de un 12,13-deshidrooleanano con el grupo aldehído en la posición C-23 y que comprende opcionalmente un grupo de ácido glucurónico en un sustituyente de carbohidrato en el grupo C-3beta-OH de la saponina, preferentemente una saponina triterpénica bidesmosídica que pertenece al tipo de un 12,13-deshidrooleanano con el grupo aldehído en la posición C-23 y que comprende un grupo de ácido glucurónico en un sustituyente de carbohidrato en el grupo C-3beta-OH de la saponina.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la al menos una saponina comprende una primera cadena de sacárido, que está unida al átomo C₃ o al átomo C₂₈ de la estructura del núcleo de aglucona de la al menos una saponina, preferentemente al átomo C₃, y/o donde la al menos una saponina comprende una segunda cadena de sacárido, que está unida al átomo C₂₈ de la estructura del núcleo de aglucona de la al menos una saponina, preferentemente la saponina comprende la primera y la segunda cadena de sacárido. Por lo tanto, cuando la saponina comprendida en el conjugado de saponina de la invención es portadora de dos glucanos (cadenas de sacáridos), la primera cadena de sacárido se une a la posición C₃ de la estructura del núcleo de aglucona y la segunda cadena de sacárido se une a la posición C₂₈ de la estructura del núcleo de aglucona.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde

- la saponina comprende una cadena de sacárido unida a la estructura del núcleo de aglucona, que se selecciona del grupo A:

GlcA-
Glc-,
Gal-,
Rha-(1→2)-Ara-,
Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-,
Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-,
Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,
Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,
Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-,
Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-,
Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA- y
derivados de estos,

o

- la saponina comprende una cadena de sacárido unida a la estructura del núcleo de aglucona, que se selecciona del grupo B:

Glc-,
Gal-,
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-,
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-,
Ara-,
Xyl-,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R1-(→4)]-Fuc- donde R1 es el ácido 4E-metoxicinámico,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R2-(→4)]-Fuc- donde R2 es el ácido 4Z-metoxicinámico,
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-di-OAc-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R3-(→4)]-3-OAc-Fuc- donde R3 es el ácido 4E-metoxicinámico,
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
(Ara- o Xyl-)(1→3)-(Ara- o Xyl-)(1→4)-(Rha- o Fuc-)(1→2)-[4-OAc-(Rha- o Fuc-)(1→4)]-(Rha- o Fuc-),
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,

Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-,
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R4-(→4)]-Fuc- donde R4 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 5 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc- donde R5 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
 6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,
 10 Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-di-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
 15 Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
 20 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-,
 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4OAc-Fuc-,
 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc- donde R6 es el ácido 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 25 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc- donde R7 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc- donde R8 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 30 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc- donde R9 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc- donde R10 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 35 Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc- donde R11 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
 Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc- donde R12 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico)
 Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal- y
 derivados de estos,

o

- la saponina es un glucósido triterpénico bidesmosídico que comprende una primera cadena de sacárido seleccionada del grupo A unida a la estructura del núcleo de aglucona y que comprende una segunda cadena de sacárido seleccionada del grupo B unida a la estructura del núcleo de aglucona. Por lo tanto, cuando la saponina comprendida en el conjugado de saponina de la invención es portadora de dos glucanos (cadenas de sacáridos), la primera cadena de sacárido se une a la posición C₃ de la estructura del núcleo de aglucona y la segunda cadena de sacárido se une a la posición C₂₈ de la estructura del núcleo de aglucona.

Sin pretender vincularse a ninguna teoría, la presencia de un grupo aldehído o un derivado de este en la estructura del núcleo de aglucona (a la que también se hace referencia en la presente como “aglucona”) es beneficiosa para la capacidad de la saponina de estimular y/o potenciar el escape endosomal de moléculas (efectoras) cuando una saponina de este tipo se colocaliza en una célula, en el endosoma de dicha célula, con estas moléculas (efectoras). Por lo tanto, se prefieren los conjugados de saponina de la invención que comprenden saponina que tiene una aglucona con un grupo aldehído. En el ácido quillaico y en la gipsogenina, el grupo aldehído está en el átomo C₂₃ de la aglucona.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina se selecciona del grupo que consiste en: saponina de corteza de *Quillaja*, dipsacósido B, saikosaponina A, saikosaponina D, macrantoidina A, esculentósido A, fitolacagenina, escinato, AS6.2, NP-005236, AMA-1, AMR, alfa-hederina, NP-012672, NP-017777, NP-017778, NP-017774, NP-018110, NP-017772, NP-018109, NP-017888, NP-017889, NP-018108, SA1641, AE X55, NP-017674, NP-017810, AG1, NP-003881, NP-017676, NP-017677, NP-017706, NP-017705, NP-017773, NP-017775, SA1657, AG2, SO1861, GE1741, SO1542, SO1584, SO1658, SO1674, SO1832, SO1862, SO1904, QS-7, QS1861, QS-7 api, QS1862, QS-17, QS-18, QS-21 A-apio, QS-21 A-xylo, QS-21 B-apio, QS-21 B-xylo, beta-escina, escina la, saponina de semilla de té I, saponina de semilla de té J, asamsaponina F, digitonina, ácido primula 1 y

AS64R, estereoisómeros de estos, derivados de estos y combinaciones de estos, preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en QS-21, un derivado de QS-21, SO1861, un derivado de SO1861, SA1641, un derivado de SA1641, GE1741, un derivado de GE1741 y combinaciones de estos, más preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en un derivado de QS-21, un derivado de SO1861 y combinaciones de estos, de la forma más preferida la saponina es un derivado de SO1861.

Tales saponinas del tipo glucósido triterpénico son capaces de potenciar el escape endosomal de moléculas (efectoras) que están presentes en el endosoma (o lisosoma) de una célula, cuando la saponina se colocaliza con tal molécula (efectora) dentro de la célula. Los inventores han establecido que la actividad potenciadora del escape endosomal de estas saponinas es aproximadamente de 100 a 1000 veces más potente cuando la saponina se pone en contacto con una célula cuando la saponina está comprendida en el conjugado de la invención. La saponina libre es capaz de estimular el suministro de moléculas (efectoras) en el citosol de las células, cuando tales células se ponen en contacto con las moléculas (efectoras) y la saponina, con una concentración de saponina 100-1000 veces mayor, en comparación con la concentración de la misma saponina que está comprendida en el conjugado de saponina de la invención, necesaria para conseguir el mismo grado de suministro de la molécula (efectora) desde el exterior de la célula hacia el interior del endosoma y finalmente en el citosol de dicha célula. En la Tabla A1 se enumeran saponinas que presentan tal actividad potenciadora del escape endosomal, así como saponinas con una gran similitud estructural con las saponinas para las que se ha establecido la capacidad de potenciar el suministro citosólico de moléculas (efectoras). Cuando la saponina forma parte del conjugado de saponina de la invención, el suministro dirigido de la saponina tras la unión del ligando para ASGPR al sitio de unión de la superficie celular en la célula diana, en dicha célula y después de la endocitosis, en el endosoma de dicha célula, es por lo tanto aproximadamente de 100 a 1000 veces más eficaz en comparación con poner en contacto la misma célula con saponina libre no dirigida que no está provista de un ligando para ASGPR para unirse a ASGPR de una célula diana.

En algunas realizaciones, el conjugado de saponina comprende al menos una saponina, donde la saponina es un derivado donde

- i. la estructura del núcleo de aglucona de la saponina comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado;
- ii. una cadena de sacárido de la saponina, preferentemente la cadena de sacárido seleccionada del grupo A, comprende un grupo carboxilo que ha sido derivatizado;
- iii. una cadena de sacárido de la saponina, preferentemente la cadena de sacárido seleccionada del grupo B, comprende un grupo acetoxi ($\text{Me}(\text{CO})\text{O}-$) que ha sido derivatizado; o
- iv. cualquier combinación de las derivatizaciones (i), (ii) y/o (iii) está presente.

Las derivatizaciones ilustrativas (i) para un grupo aldehído de la estructura del núcleo de la aglucona incluyen la reducción a un alcohol, tal como un alcohol primario; la transformación en una hidrazona; la transformación en un hemiacetal; la transformación en un acetal; la oxidación a un carboxilo; la transformación en una imina; la transformación en una oxima; la transformación en una β -hidroxiketona; o la transformación en una enona, preferentemente la reducción a un alcohol, tal como un alcohol primario; o la transformación en una hidrazona.

En algunas realizaciones, la saponina es un derivado donde la estructura del núcleo de aglucona comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante:

- la reducción a un alcohol, tal como un alcohol primario; o
- la transformación en una hidrazona de fórmula $\text{R}^b\text{HC}=\text{NNHR}^a$; preferentemente en una hidrazona de fórmula $\text{R}^b\text{HC}=\text{NNH}(\text{CO})\text{R}^a$

donde R^a es un grupo que comprende menos de 20 átomos de carbono, preferentemente menos de 10 átomos de carbono y R^b es la parte remanente de la saponina. Preferentemente, R^a es una maleimida N-alquilada. En algunas realizaciones particulares, el grupo aldehído se ha transformado en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N- ϵ -maleimidocaproico (EMCH); la hidrazida del ácido N-[β -maleimidopropiónico] (BMPH); o la hidrazida del ácido N-[κ -maleimidoundecanoico] (KMUH).

Las derivatizaciones ilustrativas (ii) para un grupo carboxilo de una cadena de sacárido incluyen: la reducción a un alcohol, tal como un alcohol primario; la transformación en una amida; la transformación en un éster; la transformación en una amina, tal como una amina primaria o secundaria; o la descarboxilación, preferentemente la reducción a un alcohol, tal como un alcohol primario; la transformación en una amida; o la transformación en un éster; más preferentemente la transformación en una amida.

Preferentemente, el grupo carboxilo que se derivatiza forma parte de un resto de ácido glucurónico y, preferentemente, la cadena de sacárido se selecciona del grupo A.

En algunas realizaciones, la saponina es un derivado donde una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, comprende un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico, que ha sido derivatizado mediante:

- la reducción a un alcohol, tal como un alcohol primario;
- la transformación en una amida de fórmula $R^aNH(CO)R^b$; o
- la transformación en un éster de fórmula $R^aO(CO)R^b$

donde R^a es un grupo que comprende menos de 20 átomos de carbono, preferentemente menos de 10 átomos de carbono y R^b es la parte remanente de la saponina. Preferentemente, R^a es una maleimida N-alkilada o un diol. En algunas realizaciones particulares, el grupo carboxilo ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD) o N-(2-aminoetil)maleimida (AEM).

Las derivatizaciones ilustrativas (iii) para un grupo acetoxi de una cadena de sacárido incluyen: la transformación en un alcohol, tal como un alcohol secundario, mediante desacetilación, opcionalmente seguida por la transformación del alcohol resultante en un éter, éster o cetona; preferentemente la transformación en un alcohol, tal como un alcohol secundario, mediante desacetilación.

Preferentemente, el grupo acetoxi que se derivatiza forma parte de una cadena de sacárido seleccionada del grupo B.

En algunas realizaciones, la saponina es un derivado donde una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, comprende un grupo acetoxi que ha sido derivatizado mediante:

- la transformación en un alcohol, tal como un alcohol secundario, mediante desacetilación; o
- la transformación en un alcohol, tal como un alcohol secundario, mediante desacetilación seguida por la transformación del alcohol resultante en un éter de fórmula R^aOR^b , un éster de fórmula $R^a(CO)OR^b$ o una cetona de fórmula $R^a(CO)R^b$

donde R^a es un grupo que comprende menos de 20 átomos de carbono, preferentemente menos de 10 átomos de carbono y R^b es la parte remanente de la saponina. Preferentemente, R^a es una maleimida N-alkilada o un diol.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la saponina es un derivado donde:

- la estructura del núcleo de aglucona comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante:
 - la reducción a un alcohol;
 - la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH);
 - la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazina del ácido N-[β-maleimidopropiónico] (BMPH); o
 - la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazina del ácido N-[κ-maleimidoundecanoico] (KMUH);
- la cadena de sacárido seleccionada del grupo A comprende un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico, que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD) o N-(2-aminoetil)maleimida (AEM);
- la cadena de sacárido seleccionada del grupo B comprende un grupo acetoxi (Me(CO)O-) que ha sido derivatizado mediante la transformación en un grupo hidroxilo (HO-); o
- cualquier combinación de las derivatizaciones (i), (ii) y/o (iii) está presente.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina es un derivado de saponina donde

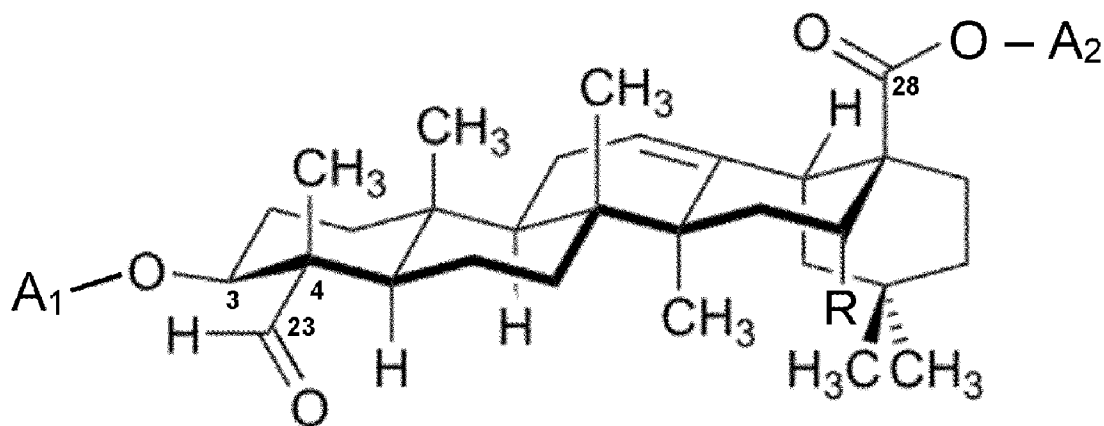
- i. el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona que comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado;
- ii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo que ha sido derivatizado;

iii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo acetoxi (Me(CO)O-) que ha sido derivatizado; o

iv. el derivado de saponina comprende cualquier combinación de las derivatizaciones i., ii. e iii., preferentemente cualquier combinación de dos derivatizaciones de las derivatizaciones i., ii. e iii.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina es una cualquiera o más de entre: SO1861, SA1657, GE1741, SA1641, QS-21, QS-21A, QS-21 A-api, QS-21 A-xyl, QS-21B, QS-21 B-api, QS-21 B-xyl, QS-7-xyl, QS-7-api, QS-17-api, QS-17-xyl, QS1861, QS1862, saponina de *Quillaja*, *Saponinum album*, QS-18, Quil-A, Gyp1, gipsósido A, AG1, AG2, SO1542, SO1584, SO1658, SO1674, SO1832, SO1904, estereoisómeros de estos, derivados de estos y combinaciones de estos, preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en QS-21, un derivado de QS-21, SO1861, un derivado de SO1861, SA1641, un derivado de SA1641, GE1741, un derivado de GE1741 y combinaciones de estos, más preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en un derivado de QS-21, un derivado de SO1861 y combinaciones de estos, de la forma más preferida la saponina es un derivado de SO1861.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina es un derivado de saponina de la saponina del ácido quillaico o la saponina de gipsogenina de acuerdo con la invención y se representa mediante la Molécula 1:



(Molécula 1)

donde

A₁ representa hidrógeno, un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado, preferentemente A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, más preferentemente A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A y A₁ comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico;

A₂ representa hidrógeno, un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado, preferentemente A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, más preferentemente A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi (Me(CO)O-), tal como uno, dos, tres o cuatro grupos acetoxi,

donde al menos uno de entre A₁ y A₂ no es hidrógeno, preferentemente A₁ y A₂ son ambos una cadena de oligosacárido;

y R es hidrógeno en la gipsogenina o hidroxilo en el ácido quillaico;

donde el derivado de saponina corresponde a la saponina representada mediante la Molécula 1 donde hay al menos una, preferentemente una o dos, más preferentemente una, de las siguientes derivatizaciones presentes:

i. el grupo aldehído en la posición C₂₃ del ácido quillaico o la gipsogenina ha sido derivatizado;

ii. el grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico de A₁, cuando A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A y A₁ comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico, ha sido derivatizado;

y

iii. uno o más, preferentemente la totalidad, de(l) (los) grupo(s) acetoxi de un resto de sacárido o de dos o más restos de sacárido de A₂, cuando A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi, ha/n sido derivatizado/s.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A y comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico y donde el grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico de A₁ ha sido derivatizado y/o donde A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi y donde al menos un grupo acetoxi de A₂ ha sido derivatizado.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina representada mediante la Molécula 1 es una saponina triterpénica bidesmosídica.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el derivado de saponina corresponde a la saponina representada mediante la Molécula 1 donde hay al menos una, preferentemente una o dos, más preferentemente una, de las siguientes derivatizaciones presentes:

i. el grupo aldehído en la posición C₂₃ del ácido quillaico o la gipsogenina ha sido derivatizado mediante;

- la reducción a un alcohol;
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona una saponina-Ald-EMCH tal como SO1861-Ald-EMCH o QS-21-Ald-EMCH, donde el grupo maleimida de EMCH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol;
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico] (BMPH), donde el grupo maleimida de BMPH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; o
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[κ-maleimidoundecanoico] (KMUH), donde el grupo maleimida de KMUH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; o

ii. el grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico de A₁, cuando A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A y A₁ comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico, ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD) o N-(2-aminoetil)maleimida (AEM), con lo que se proporciona una saponina-Glu-AMPD tal como QS-21-Glu-AMPD o SO1861-Glu-AMPD o una saponina-Glu-AEM tal como QS-21-Glu-AEM o SO1861-Glu-AEM; y

iii. uno o más, preferentemente la totalidad, de(l) (los) grupo(s) acetoxi de un resto de sacárido o de dos o más restos de sacárido de A₂, cuando A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi, ha/n sido derivatizado/s mediante la transformación en un grupo hidroxilo (HO-) mediante desacetilación.

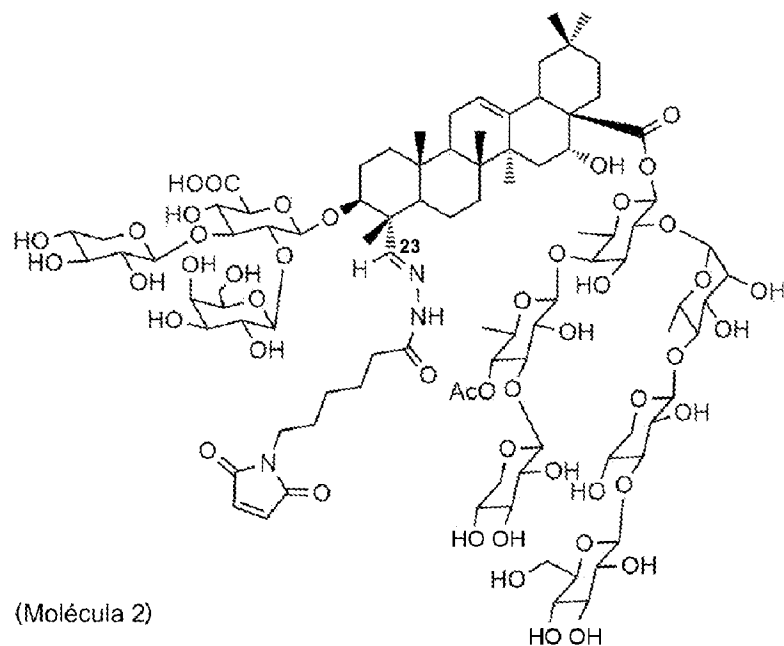
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde A₁ es Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA y/o A₂ es Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc, preferentemente la saponina representada mediante la Molécula 1 es el ácido 3-O-beta-D-galactopiranosil-(1→2)-[beta-D-xilopiranosil-(1→3)]-beta-D-glucuronopiranosilquillaico 28-O-beta-D-glucopiranosil-(1→3)-beta-D-xilopiranosil-(1→4)- alfa-L-ramnopiranosil-(1→2)-[beta-D-xilopiranosil-(1→3)-4OAc-beta-D-quinovopiranosil-(1→4)]-beta-D-fucopiranosido, más preferentemente la saponina es una cualquiera o más de entre: SO1861, GE1741, SA1641 y QS-21, o un derivado de estas, más preferentemente SO1861 o un derivado de esta.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina es un derivado de saponina donde

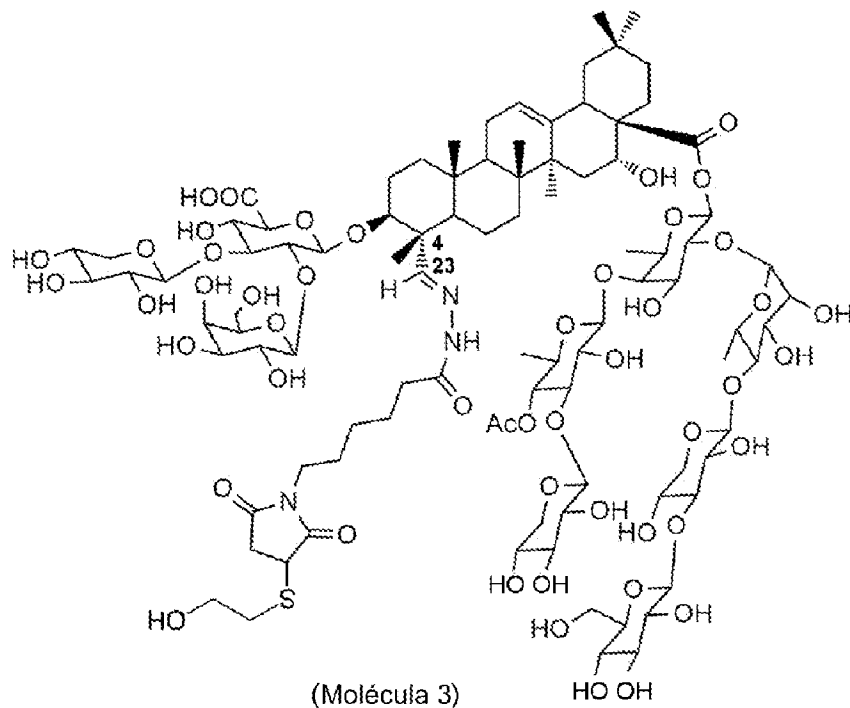
i. el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona que comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante;

- la reducción a un alcohol;
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona una saponina-Ald-EMCH tal como SO1861-Ald-EMCH o QS-21-Ald-EMCH, donde el grupo maleimida de EMCH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol;

- a transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico] (BMPH), donde el grupo maleimida de BMPH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; o
 - la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[κ-maleimidoundecanoico] (KMUH), donde el grupo maleimida de KMUH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; o
- ii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD) o *N*-(2-aminoetil)maleimida (AEM), con lo que se proporciona una saponina-Glu-AMPD tal como QS-21-Glu-AMPD o SO1861-Glu-AMPD o una saponina-Glu-AEM tal como QS-21- Glu-AEM o SO1861-Glu-AEM;
- iii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo acetoxi (Me(CO)O-) que ha sido derivatizado mediante la transformación en un grupo hidroxilo (HO-) mediante desacetilación; o
- iv. el derivado de saponina comprende cualquier combinación de las derivatizaciones i., ii. e iii., preferentemente cualquier combinación de dos derivatizaciones de las derivatizaciones i., ii. e iii;
- preferentemente el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona donde la estructura del núcleo de aglucona comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con EMCH donde el grupo maleimida de EMCH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol.
- Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la saponina es un derivado de saponina donde
- i. el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona que comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona una saponina-Ald-EMCH tal como SO1861-Ald -EMCH o QS-21-Ald-EMCH;
 - ii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con *N*-(2-aminoetil)maleimida (AEM), con lo que se proporciona una saponina-Glu-AEM tal como QS-21- Glu-AEM o SO1861-Glu-AEM; o
 - iii. el derivado de saponina comprende una combinación de las derivatizaciones i. y ii.
- Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona donde la estructura del núcleo de aglucona comprende un grupo aldehído y donde el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico, donde el resto de ácido glucurónico ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con *N*-(2-aminoetil)maleimida (AEM).
- Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el derivado de saponina se representa mediante la Molécula 2:

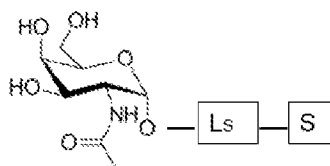


o donde el derivado de saponina se representa mediante la Molécula 3:



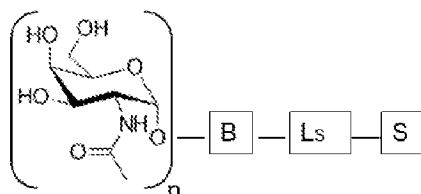
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la al menos una saponina y el ligando para ASGPR están unidos covalentemente de forma directa o a través de al menos un conector.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el resto de GalNAc está unido a la saponina S preferentemente a través de un conector de saponina L_s, tal como se representa en la fórmula (II)_S:



(II)_s

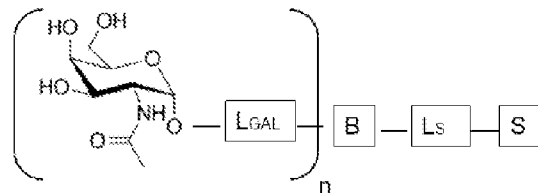
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde los restos de GalNAc están unidos covalentemente cada uno por separado a través del oxígeno en la posición "1" del resto de GalNAc a un resto que actúa como puente central B, el cual forma de hecho un puente entre los restos de GalNAc y el resto de saponina, preferentemente a través de un conector del resto de saponina L_S, tal como se muestra en la fórmula (III)_s:



(III)_s

donde n es un número entero superior o igual a 2, preferentemente n es 3, L_S es un conector del resto de saponina y S es el resto de saponina.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde los restos de GalNAc están unidos al resto que actúa como puente B a través de los conectores de GalNAc L_{GAL} tal como se muestra en la fórmula (IV)_s:



(IV)_s

donde n es un número entero superior o igual a 2, preferentemente n es 3, L_S es un conector del resto de saponina y S es el resto de saponina.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conector del resto de saponina L_S representa cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente una saponina a GalNAc como en la fórmula (II)_s o al resto que actúa como puente B como en la fórmula (III)_s y (IV)_s.

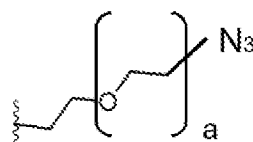
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conector del resto de saponina L_S es el resultado de una reacción de acoplamiento entre al menos un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, donde L_{S1} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y L_{S2} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente al resto de saponina.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conector del resto de saponina L_S es el resultado de una reacción de acoplamiento entre al menos un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, donde la reacción de acoplamiento se selecciona del grupo que consiste en una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleófila de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido, una reacción de un carbonilo que no sea de tipo aldólica y una adición a un doble enlace carbono-carbono, preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleófila de anillo de

electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido, más preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino o un acoplamiento de tiol y maleimida.

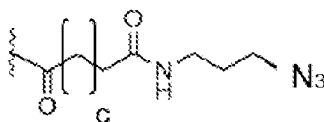
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conector del resto de saponina L_S es el resultado de una reacción de acoplamiento entre un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B, comprendiendo el primer precursor L_{S1} una azida; y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, comprendiendo el segundo precursor L_{S2} un alquino y comprendiendo preferentemente una hidrazona resultante de un acoplamiento de hidrazida/aldehído con un aldehído del resto de saponina.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la estructura para el precursor L_{S1} es la siguiente azida de fórmula (XVII):



(XVII)

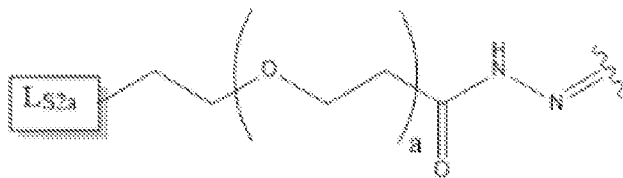
donde a representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente a representa un número entero seleccionado entre 1, 2 y 3, más preferentemente a representa 2, o donde la estructura para el precursor L_{S1} comprende la siguiente azida de fórmula (XVIII):



(XVIII)

donde c representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente c representa un número entero en el intervalo de 5-15, más preferentemente c representa 9.

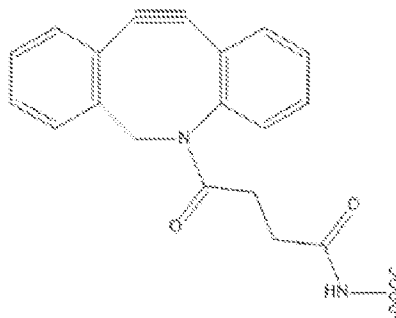
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la estructura para el precursor L_{S2} comprende la siguiente hidrazona de fórmula (XIX):



(XIX)

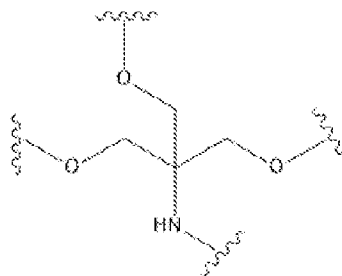
donde a representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente a representa un número entero en el intervalo de 2-6, más preferentemente a representa 4, y donde L_{S2a} representa un resto que contiene un alquino.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde L_{S2a} comprende menos de 20 átomos de carbono, preferentemente L_{S2a} representa un resto de acuerdo con la fórmula (XX):



(XX)

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el resto que actúa como puente es un compuesto de fórmula (XV):



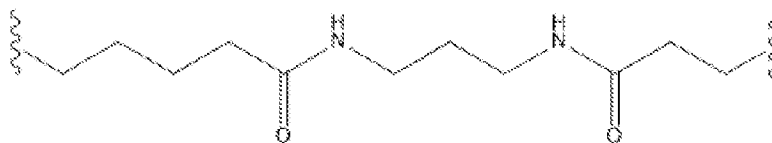
(XV)

donde los átomos de oxígeno del compuesto de fórmula (XV) están unidos a GalNAc o a los conectores de GalNAc L_{GAL}, y el átomo de nitrógeno del compuesto de fórmula (XV) está unido al conector del resto de saponina L_S.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde L_{GAL} representa cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente GalNAc al resto que actúa como puente B.

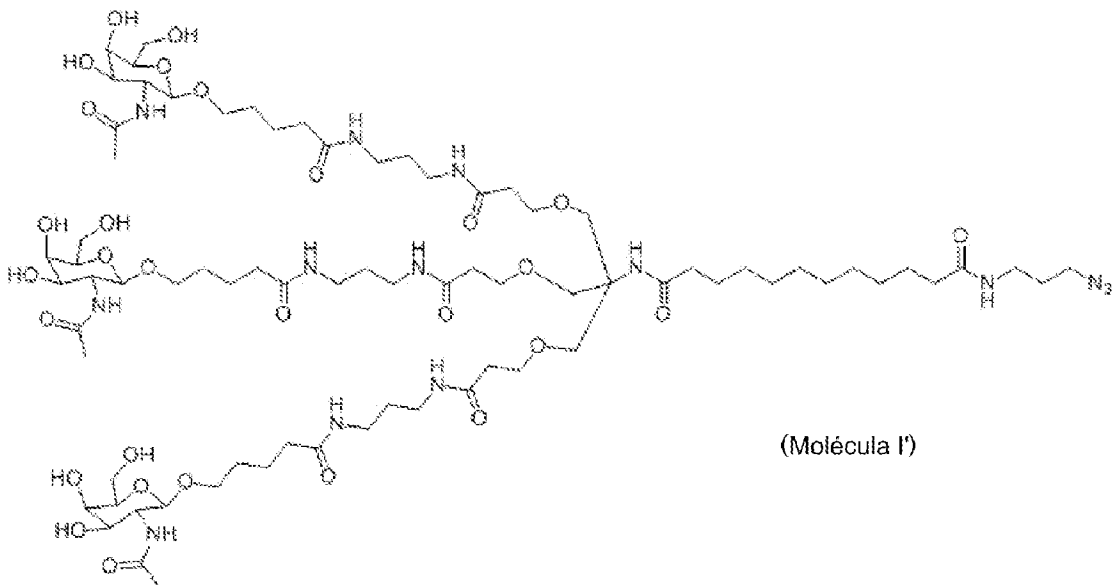
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde L_{GAL} comprende 2-25 átomos de carbono, preferentemente 7-15 átomos de carbono, más preferentemente 11 átomos de carbono y donde L_{GAL} comprende al menos uno, preferentemente dos restos de amida.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde L_{GAL} es un compuesto de acuerdo con la fórmula (XVI):

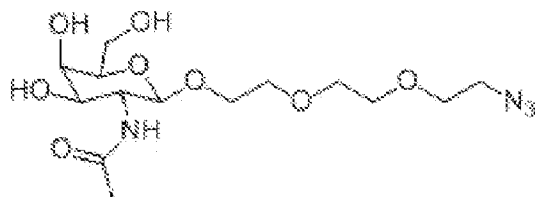


(XVI)

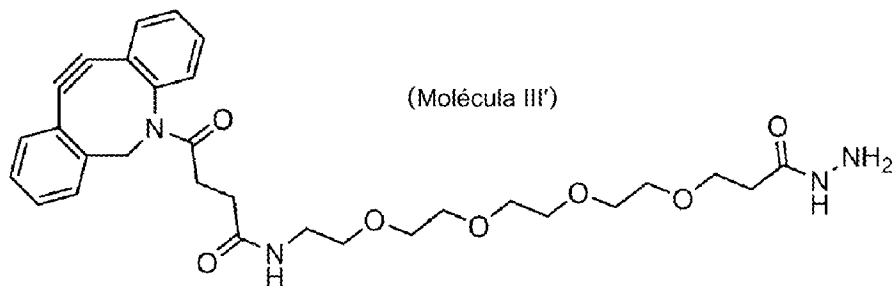
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el ligando para ASGPR es (GalNAc)₃Tris representado mediante la Molécula I':



25 o donde el ligando para ASGPR es mono-GalNAc representado mediante la Molécula II':



Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la al menos una saponina está unida covalentemente a la Molécula I' o la Molécula II' de la invención a través de un conector representado mediante la Molécula III':



55 donde el resto de hidrazida de la Molécula III' formó un enlace de tipo hidrazona covalente con un grupo aldehído en la saponina, y donde el grupo dibenzociclooctino formó un enlace covalente con el grupo azida de la Molécula I' o la Molécula II'.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde la al menos una saponina está unida covalentemente al ligando para ASGPR a través de al menos un conector escindible.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conector escindible es objeto de escisión en condiciones ácidas, condiciones reductoras, condiciones enzimáticas y/o condiciones inducidas por la luz, y preferentemente el conector escindible comprende un enlace escindible seleccionado entre un enlace de tipo hidrazona y un enlace de tipo hidrazida que es objeto de escisión en condiciones ácidas, y/o un enlace sensible a la proteólisis, por ejemplo, proteólisis por parte de la catepsina B, y/o un enlace sensible a la escisión en condiciones reductoras, tal como un puente de disulfuro.

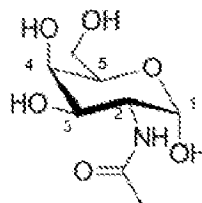
Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conector escindible es objeto de escisión *in vivo* en condiciones ácidas tales como, por ejemplo, las presentes en los endosomas y/o lisosomas de células de mamífero, preferentemente células humanas, preferentemente el conector escindible es objeto de escisión *in vivo* a un pH de 4,0 – 6,5, y más preferentemente a un pH $\leq$ 5,5.

Una realización es el conjugado de saponina de la invención, donde el conjugado comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 16, 32, 64, 128 o 1-100 restos de saponina, o cualquier número de restos de saponina comprendido entre estos, tal como 7, 9, 12 restos de saponina.

El experto entenderá que si la saponina comprendida en el conjugado de saponina de la presente invención es un compuesto de fórmula (II)_S, (III)_S o (IV)_S tal como se describe en la presente, donde el conector del resto de saponina L_S es el resultado de una reacción de acoplamiento entre un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, comprendiendo el segundo precursor L_{S2} una hidrazona resultante de un acoplamiento de hidrazida/aldehído con un aldehído del resto de saponina, tal como se describe en la presente, esto significa que el grupo aldehído ya está ocupado por el conector, de modo que los derivados de saponina adecuados son aquellos en los que la saponina está derivatizada mediante (ii) un grupo carboxilo de una cadena de sacárido tal como se describe en la presente y/o (iii) un grupo acetoxi de una cadena de sacárido tal como se describe en la presente.

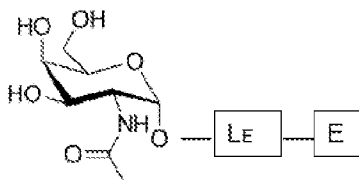
Conjugado de molécula efectora – introducción

Ciertas combinaciones farmacéuticas y ciertas composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para el receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), al que se hace referencia en la presente como “conjugado de molécula efectora”. Cuando la molécula efectora se une a la parte remanente del conjugado de molécula efectora, se hace referencia a ello en la presente como “resto efector”. El ligando de ASGPR comprende al menos un resto de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc). De acuerdo con las realizaciones preferidas de la presente invención, cada resto de GalNAc está unido a la parte remanente del ligando de ASGPR o, en el caso de que el ligando de ASGPR consista en un único resto de GalNAc, al resto efector, a través de un enlace covalente con el oxígeno en la posición “1” tal como se indica en la fórmula (I):



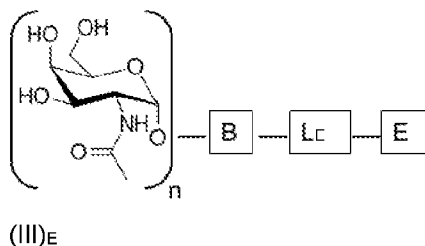
(I)

Tal como se muestra en la fórmula (II)_E, el ligando de ASGPR consiste en un único resto de GalNAc unido al resto efector E, preferentemente a través de un conector del resto efector L_E.

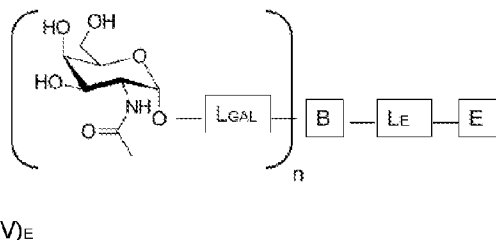


(II)_E

El ligando de ASGPR puede comprender más de un resto de GalNAc, tal como 2, 3, 4, 5 o 6 restos de GalNAc, preferentemente 3 o 4 restos de GalNAc. En tal caso, se prefiere que los restos de GalNAc estén unidos covalentemente cada uno por separado a través del oxígeno en la posición "1" a un resto que actúa como puente central B, el cual forma de hecho un puente entre los restos de GalNAc y el resto efector, preferentemente a través de un conector del resto efector L_E . Los restos de GalNAc pueden unirse directamente al resto que actúa como puente B tal como se muestra en la fórmula (III)_E:



donde n es un número entero superior o igual a 2, L_E es un conector del resto efector y E es el resto efector. Más preferentemente, los restos de GalNAc se unen al resto que actúa como puente B a través de conectores de GalNAc L_{GAL} tal como se muestra en la fórmula (IV)_E:

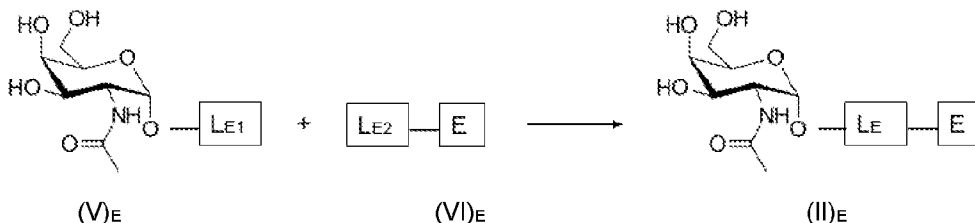


donde n es un número entero superior o igual a 2, L_E es un conector del resto efector y E es el resto efector. Si bien cada aparición de L_{GAL} se puede seleccionar independientemente, el experto apreciará que la síntesis del conjugado se simplifica en el caso de que cada aparición de L_{GAL} represente el mismo resto.

Conjugado de molécula efectora conjugada - conector L_E

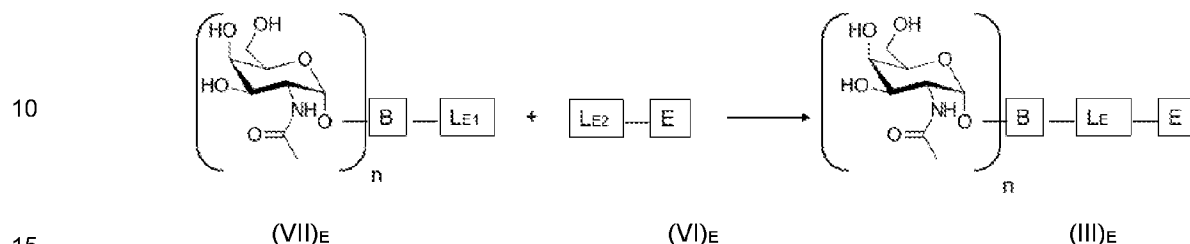
El conector del resto efector L_E representa cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente un resto efector a GalNAc como en la fórmula (II)_E o al resto que actúa como puente B como en la fórmula (III)_E y (IV)_E. La identidad y el tamaño del conector no se ven limitados particularmente y la unión covalente de una molécula efectora a GalNAc como en la fórmula (II)_E o al resto que actúa como puente B como en la fórmula (III)_E y (IV)_E se puede efectuar mediante un grupo funcional químico "habitual" (p. ej., un enlace de tipo éter), así como mediante conectores de tipo "química click", los cuales tienen habitualmente una longitud de la cadena larga, lo que da como resultado un conector L_E que comprende, p. ej., más de 10 o más de 20 átomos de carbono. Los conectores del resto efector L_E adecuados y las reacciones de acoplamiento asociadas se describen en el manual Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013.

Como entenderá el experto, el conector del resto efector L_E será habitualmente el resultado de una reacción de acoplamiento (p. ej., de tipo "química click") entre al menos un primer precursor L_{E1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{E2} unido covalentemente al resto efector. Este principio se ilustra en el siguiente esquema de reacción para el compuesto de fórmula (II):



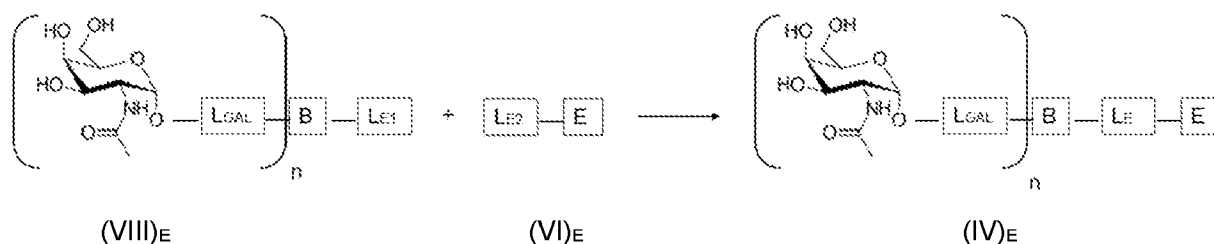
donde L_E es un conector del resto efector, L_{E1} es un precursor del conector del resto efector L_E que está unido covalentemente a GalNAc y L_{E2} es un precursor del conector del resto efector L_E que está unido covalentemente al resto efector y E es el resto efector.

5 El esquema de reacción correspondiente para el compuesto de fórmula (III) es el siguiente:



donde L_E es un conector del resto efector, L_{E1} es un precursor del conector del resto efector L_E que está unido covalentemente a GalNAc y L_{E2} es un precursor del conector del resto efector L_E que está unido covalentemente al resto efector, n es un número entero superior o igual a 2 y E es el resto efector.

20 El esquema de reacción correspondiente para el compuesto de fórmula (IV)_E es el siguiente:

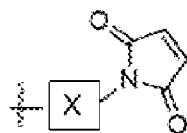


donde L_E es un conector del resto efector, L_{E1} es un precursor del conector del resto efector L_E que está unido covalentemente a GalNAc y L_{E2} es un precursor del conector del resto efector L_E que está unido covalentemente al resto efector, n es un número entero superior o igual a 2, E es el resto efector y L_{GAL} es un conector de GalNAc y B es un resto que actúa como puente.

El conector del resto efector L_E puede ser el resultado de una reacción de acoplamiento entre al menos un primer precursor L_{E1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente y un segundo precursor L_{E2} unido covalentemente al resto efector, donde la reacción de acoplamiento es, por ejemplo, una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleófila de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido (tales como aziridinas, epóxidos, sulfatos cíclicos, iones de aziridinio, iones de episulfonio), una reacción de un carbonilo que no sea de tipo aldólica (tal como la formación de urea, tiourea, hidrazona, éter de oxima, amida o heterociclo aromático) o una adición a un doble enlace carbono-carbono (tal como una epoxidación, aziridinación, dihidroxilación, adición de haluro de sulfentilo, adición de haluro de nitrosilo o adición de Micheal), preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleófila de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido, más preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino o un acoplamiento de tiol y maleimida.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, el conector del resto efector L_E comprende un resto de tioéter de una succinimida. Tal tioéter de una succinimida es, p. ej., el resultado de un acoplamiento de tiol y maleimida entre una maleimida N-sustituida y un compuesto que contiene un tiol o sulfhidrilo. Este acoplamiento de tiol y maleimida es una herramienta de química "click" conocida de forma generalizada en el campo de la bioconjugación y se describe, por ejemplo, en Hermanson, Greg T. *Bioconjugate techniques*. Academic press, 2013 página 289. Por consiguiente, se prefiere que el conector del resto efector L_E sea el resultado de una reacción de acoplamiento entre un primer precursor L_{E1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente, comprendiendo el primer precursor L_{E1} una maleimida N-sustituida; y un segundo precursor L_{E2} unido covalentemente al resto efector, comprendiendo el segundo precursor L_{E2} un tiol o un precursor de este. Un precursor de tiol adecuado es un disulfuro, que se puede escindir (p. ej., *in situ*) mediante la reducción al tiol correspondiente.

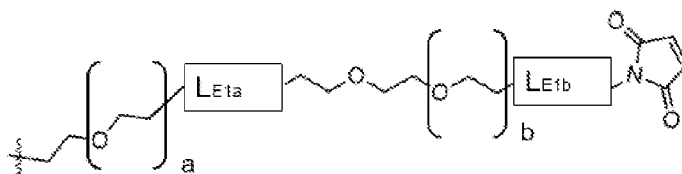
Una estructura preferida para el precursor L_{E1} presente en los compuestos de fórmula (V)_E, (VIII)_E o (VIII)_E es la siguiente maleimida N-sustituida terminal:



(IX)

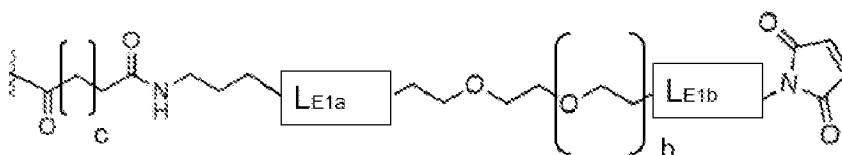
donde X representa cualquier conector adecuado para unir covalentemente la maleimida N-sustituida terminal a GalNAc o al resto que actúa como puente B. Como comprenderá el experto, X puede ser el resultado de una reacción de acoplamiento entre un primer resto unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente y un segundo resto unido covalentemente a la maleimida. X puede comprender una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol. Siempre que se haga referencia a un 1,2,3-triazol en el contexto de los conectores de la presente solicitud, esto significa preferentemente un 1H-1,2,3-triazol.

Las realizaciones de la estructura para el precursor L_{E1} presente en los compuestos de fórmula (V)_E, (VIII)_E u (VIII)_E son las siguientes maleimidas N-sustituidas terminales:



(X)

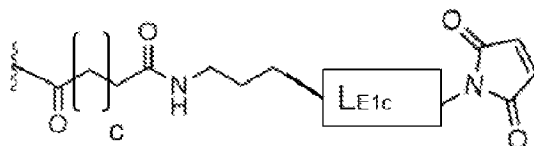
donde a y b representan cada uno independientemente un número entero superior o igual a 0, preferentemente a y b representan cada uno independientemente un número entero seleccionado entre 0, 1, 2 y 3, más preferentemente a y b representan 2, y donde L_{E1a} representa una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol, preferentemente un 1,2,3-triazol y donde L_{E1b} representa una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol, preferentemente una hidrazona;



(XI)

donde b y c representan cada uno independientemente un número entero superior o igual a 0, preferentemente b representa un número entero seleccionado entre 0, 1, 2 y 3 y c representa un número entero en el intervalo de 5-15, más preferentemente b representa 2, y c representa 9, donde L_{E1a} representa una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol, preferentemente un 1,2,3-triazol y donde L_{E1b} representa una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol, preferentemente una hidrazona;

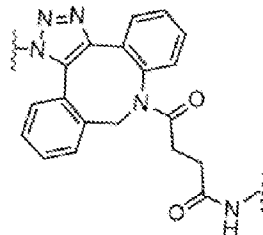
y



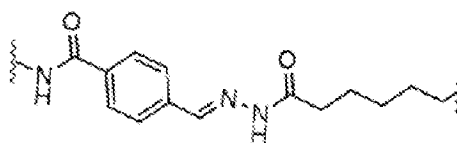
(XII)

donde c representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente c representa un número entero en el intervalo de 5-15, más preferentemente c representa 9, donde L_{E1c} representa una hidrazona y/o un 1,2,3-triazol, preferentemente un 1,2,3-triazol.

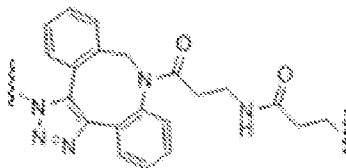
L_{E1a} , L_{E1b} y L_{E1c} comprenden cada uno preferentemente menos de 20 átomos de carbono, más preferentemente L_{E1a} , L_{E1b} y L_{E1c} representan cada uno independientemente un resto de acuerdo con la fórmula (XIII), (XIV) o (XV), preferentemente L_{E1a} es el 1,2,3-triazol de fórmula (XIII), L_{E1b} es la hidrazona de fórmula (XIV) y L_{E1c} es el 1,2,3-triazol de fórmula (XV):



(XIII)



(XIV)



(XV)

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el conjugado de molécula efectora es un compuesto de fórmula (II)_E, (III)_E o (IV)_E tal como se describe en la presente, donde el conector del resto efector L_E es el resultado de una reacción de acoplamiento entre un compuesto de fórmula (V)_E, (VII)_E u (VIII)_E con un compuesto de fórmula (VI)_E, donde el primer precursor L_{E1} es una maleimida N-sustituida terminal de fórmula (X), (XI) o (XII), donde L_{E1a} es, por ejemplo, el 1,2,3-triazol de fórmula (XIII), L_{E1b} es, por ejemplo, la hidrazona de fórmula (XIV) y L_{E1c} es, por ejemplo, el 1,2,3-triazol de fórmula (XV).

Conjugado de molécula efectora - resto efector

Un aspecto de la invención se refiere a una combinación farmacéutica que comprende:

- una primera composición farmacéutica que comprende el conjugado de saponina de la invención y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable; y
- una segunda composición farmacéutica que comprende un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR, donde el ligando para ASGPR comprende preferentemente al menos un resto de GalNAc, preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

- el conjugado de saponina de la invención;
- un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR, donde el ligando para ASGPR comprende preferentemente al menos un resto de GalNAc, preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la

superficie celular y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

5 Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora comprende o consiste en al menos una de entre una molécula de bajo peso molecular tal como una molécula que sea un fármaco, una toxina tal como una toxina proteica, un oligonucleótido tal como un BNA, un ácido xenonucleico o un ARNip, una enzima, un péptido, una proteína o cualquier combinación de estos, preferentemente, la molécula efectora es una toxina, una enzima o un oligonucleótido.

10 Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde el ligando para ASGPR comprende o es (GalNAc)₃Tris, y/o donde el ligando para ASGPR y la molécula efectora se conjugan a través de un enlace covalente, preferentemente a través de al menos un conector.

15 Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es un oligonucleótido seleccionado entre uno cualquiera o más de los siguientes: ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), anti-microARN horquillado (miARN), ARN monocatenario, ARN aptámero, ARN bicatenario (ARNbc), anti-microARN (anti-miARN, anti-miR), oligonucleótido antisentido (ASO), ADN, ADN antisentido, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico con puente (BNA), ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-aminoetileno (BNA^{NC}), ARNip basado en BNA y oligonucleótido antisentido basado en BNA (BNA-AON).

20 Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es un oligonucleótido seleccionado entre uno cualquiera o más de los siguientes: anti-miARN, un BNA-AON o un ARNip, tal como ARNip basado en BNA, seleccionado entre ARNip modificado químicamente, ARNip estable metabólicamente y ARNip modificado químicamente y estable metabólicamente.

25 Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es un oligonucleótido capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de silenciar uno cualquiera de los genes: apolipoproteína B (apoB), HSP27, transtiretina (TTR), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), delta-aminolevulinato sintasa 1 (ALAS1), antitrombina 3 (AT3), glicolato oxidasa (GO), componente del complemento C5 (CC5), gen X del virus de la hepatitis B (VHB), gen S del VHB, alfa-1 antitripsina (AAT) y lactato deshidrogenasa (LDH), y/o es un oligonucleótido capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de dirigirse a un miARN anómalo.

30 A pesar de los avances en la implementación de cambios en el estilo de vida y el tratamiento farmacológico para la prevención, las enfermedades cardiovasculares siguen siendo una causa importante del total de años de vida perdidos [B.G. Nordestgaard *et al.*, *Advances in lipid-lowering therapy through gene-silencing technologies*, *Nature Reviews – Cardiology*, V 15, mayo de 2018, págs. 261-272]. Sigue permaneciendo un riesgo residual sustancial de enfermedad cardiovascular incluso después de una intervención óptima en el estilo de vida, un tratamiento antihipertensivo, una terapia con estatinas en dosis altas y después del tratamiento con clases más nuevas de terapia para reducir los lípidos, tales como el inhibidor de la absorción de colesterol ezetimiba, los inhibidores de PCSK9 evolocumab y bococizumab, el agente de tipo fibrato reductor de lípidos bezafibrato, el inhibidor de la proteína de transferencia de éster de colesterol anacetrapib, y el agente antiinflamatorio canakinumab. Las terapias en desarrollo, en particular la inhibición de oligonucleótidos antisentido o las estrategias basadas en ARN interferente pequeño (ARNip), emplean tecnologías de silenciamiento de genes a través de la degradación de ARNm. Mientras que los agentes reductores de lípidos que son moléculas de bajo peso molecular se administran por vía oral, los fármacos de silenciamiento de genes generalmente se inyectan por vía subcutánea. Las tecnologías de silenciamiento de genes inhiben la expresión de genes dentro de los núcleos celulares o el citoplasma para reducir la producción de proteínas, lo que da como resultado una reducción de los niveles de lipoproteínas en plasma en cantidades de gramos. Los oligonucleótidos antisentido y los ARNip se formulan con el objetivo de conseguir concentraciones mucho más elevadas dentro de las células hepáticas que en el plasma. Las terapias de silenciamiento de genes tienen como diana las proteínas tanto en el plasma como dentro de las células. Lo más probable es que LDL provoque aterosclerosis a través del depósito de colesterol en la íntima. Un requisito previo para un infarto de miocardio (IM) o un evento de accidente cerebrovascular isquémico es el desarrollo de aterosclerosis dentro de las arterias coronarias y otras arterias. La iniciación de la placa aterosclerótica se produce por la infiltración de LDL y lipoproteínas remanentes del plasma en la íntima de las arterias, facilitada por un gradiente de presión arterial. El avance de la placa aterosclerótica se puede producir si los niveles de LDL y lipoproteínas remanentes permanecen elevados en el plasma durante períodos prolongados de tiempo. La disfunción endotelial, que conduce a un aumento del flujo de estas lipoproteínas hacia la íntima, puede potenciar aún más el avance de la aterosclerosis. La ruptura de la placa que conduce al IM o al accidente cerebrovascular isquémico se produce habitualmente en sitios de placas ateroscleróticas inestables con inflamación local en curso y sin capa

fibrosa. Después de la ruptura de la placa, las plaquetas activadas y la fibrina generan un trombo que puede aumentar más de tamaño si los niveles elevados de Lp(a) inhiben la fibrinólisis a través de su homología con el plasminógeno. Finalmente, una reducción sustancial de LDL y las lipoproteínas remanentes en plasma puede estabilizar la placa al reducir el tamaño de la placa y la inflamación local. Las tecnologías de silenciamiento de genes se basan en el dogma central de la biología molecular: la transcripción de ADN en ARNm y la traducción de ARNm en proteínas. Si existe constancia de que la secuencia de ADN de un gen influye en los niveles de una fracción de lipoproteína causante de una enfermedad cardiovascular, es posible sintetizar una sola hebra de ARN (oligonucleótido antisentido) o una doble hebra de ARN (ARNip) que se unirá al producto de ARNm de ese gen y lo inactivará, con lo que de hecho se desactiva, o silencia, ese gen. Un reto con el que se encuentran las estrategias de silenciamiento de genes basadas en oligonucleótidos antisentido o ARNip son los posibles efectos adversos o fuera de la diana, que se minimizan al suministrar preferentemente el medicamento a las células hepáticas y de este modo se mantienen bajas las concentraciones del fármaco en el resto del cuerpo. Actualmente, la mejor forma de suministrar selectivamente oligonucleótidos antisentido o ARNip a las células hepáticas consiste en unir estos fármacos o sus sistemas de suministro a restos de N-acetilgalactosamina (GalNAc), lo que facilita la captación selectiva en las células hepáticas a través del receptor de asialoglicoproteína. Tales fármacos de silenciamiento de genes con un resto de GalNAc conjugado aumentarán sustancialmente la potencia del fármaco, reducirán los niveles del fármaco en plasma y ofrecerán la promesa de menos efectos adversos.

Las terapias de silenciamiento de genes para reducir lípidos se evalúan en ensayos de fase II y fase III. Además de silenciar el gen de la apolipoproteína B, los genes ANGPTL3, APOC3, LPA y PCSK9, que están activos en varias vías de lipoproteínas, también son dianas para las terapias de silenciamiento de genes. Un ejemplo de una terapia de silenciamiento de genes de lipoproteínas es Mipomersén, que es un oligonucleótido antisentido que se une directamente a la secuencia de ARNm que codifica la proteína apoB, que es la proteína predominante transportada en LDL, lipoproteínas remanentes y Lp(a).

Parte de la invención es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es un oligonucleótido, preferentemente un ARNip tal como un ARNip basado en BNA, o un oligonucleótido antisentido tal como un oligonucleótido antisentido basado en BNA, por ejemplo, un AON basado en un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-aminoetileno, que es capaz, preferentemente cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de silenciar el gen de la apolipoproteína B (apoB).

Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es un oligonucleótido que es capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de dirigirse a un ARNm implicado en la expresión de una cualquiera de las proteínas: apoB, HSP27, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, producto de expresión del gen X del VHB, producto de expresión del gen S del VHB, AAT y LDH, o es capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de antagonizar o restaurar una función de miARN tal como inhibir un miARN oncogénico (miR-onco) o suprimir la expresión de un miR-onco.

Parte de la invención es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es un oligonucleótido, preferentemente un ARNip tal como un ARNip basado en BNA, o un oligonucleótido antisentido tal como un oligonucleótido antisentido basado en BNA, por ejemplo, un AON basado en un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-aminoetileno, que es capaz, preferentemente cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de dirigirse a un ARNm implicado en la expresión de la proteína apoB. Es decir, la unión del oligonucleótido comprendido en el conjugado que comprende el resto efector al ARNm de apoB da como resultado el silenciamiento de la expresión de la proteína apolipoproteína B.

Sorprendentemente, los inventores han establecido ahora un silenciamiento génico eficaz y mejorado de apoB mediante el tratamiento con un BNA-AON en combinación con un conjugado de un ligando para ASGPR, en la presente tri-GalNAc, y una saponina. La saponina, en la presente SO1861 a modo de ejemplo, es conocida por su actividad para facilitar el escape endosomal de una molécula que entra en el endosoma, p. ej., a través de la captación celular mediada por receptores. El silenciamiento del gen de apoB dio como resultado una reducción de los niveles de ARNm para expresar la proteína ApoB, un nivel más bajo de ApoB en plasma y niveles más bajos de LDL en plasma, después del tratamiento con la combinación terapéutica de un conjugado de AON que comprende GalNAc y un conjugado de saponina que comprende GalNAc. El efecto de silenciamiento del gen se manifiesta a las 72 h después de una sola administración de la combinación de dichos dos conjugados, e incluso después de más de 10 días, p. ej., después de 14 días.

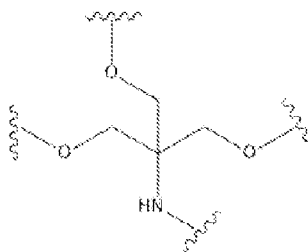
Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula efectora es o comprende una toxina donde la toxina comprende o consiste en al menos una molécula seleccionada entre uno cualquiera o más de un péptido, una proteína, una enzima tal como la ureasa y Cre-recombinasa, una toxina proteinácea, una proteína que inactiva los ribosomas, y/o una toxina bacteriana, una toxina

vegetal, más preferentemente se selecciona entre una cualquiera o más de una toxina vírica tal como apoptina; una toxina bacteriana tal como una toxina Shiga, toxina similar a Shiga, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) o exotoxina A de PE, toxina diftérica (DT) de longitud completa o truncada, toxina del cólera; una toxina fúngica tal como la alfa-sarcina; una toxina vegetal que incluye proteínas que inactivan los ribosomas y la cadena A de proteínas que inactivan los ribosomas de tipo 2 tal como la diantina, p. ej., diantina-30 o diantina-32, saporina, p. ej., saporina-S3 o saporina-S6, bouganina o un derivado desinmunizado debouganina de bouganina, toxina A similar a shiga, proteína antivírica de *Phytolacca americana*, ricina, cadena A de ricina, modicina, cadena A de modicina, abrina, cadena A de abrina, volkensina, cadena A de volkensina, viscumina, cadena A de viscumina; o una toxina animal o humana tal como RNasa de rana, o granzima B o angiogenina de seres humanos, o cualquier fragmento o derivado de estas; preferentemente, la toxina proteica es diantina y/o saporina, y/o comprende o consiste en al menos una de entre una toxina que tiene como diana los ribosomas, una toxina que tiene como diana el factor de elongación, una toxina que tiene como diana la tubulina, una toxina que tiene como diana el ADN y una toxina que tiene como diana el ARN, más preferentemente una cualquiera o más de entre emtansina, pasudotox, derivado maitansinoide DM1, derivado maitansinoide DM4, monometilauristatina E (MMAE, vedotina), monometilauristatina F (MMAF, mafodotina), una caliqueamicina, N-acetil-γ-caliqueamicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina (PBD), una benzodiazepina, un análogo CC-1065, una duocarmicina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, cisplatino, ciclofosfamida, etopósido, docetaxel, 5-fluorouracilo (5-FU), mitoxantrona, una tubulisina, una indolinobenzodiazepina, AZ13599185, una criptoficina, rizoxina, metotrexato, una antraciclina, un análogo de camptotecina, SN-38, DX-8951f, mesilato de exatecano, forma truncada de una exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (PE38), un derivado de duocarmicina, una amanitina, α-amanitina, una espliceostatina, una tailanestatina, ozogamicina, tesirina, amberestatina 269 y soravtansina, o un derivado de estos.

Conjugados - resto que actúa como puente B

El resto que actúa como puente B presente en los conjugados de saponina de fórmula (III)_S o (IV)_S y en los conjugados de molécula efectora de fórmula tal como (III)_E o (IV)_E descrito en la presente representa cualquier resto adecuado para unir covalentemente 2 o más, preferentemente 3 o 4, más preferentemente 3 restos de GalNAc y el conector del resto de saponina L_S o el conector del resto efector L_E.

De acuerdo con las realizaciones preferidas, el resto que actúa como puente B es un compuesto de fórmula (XV):



(XV)

donde los átomos de oxígeno del compuesto de fórmula (XV) están unidos a GalNAc (lo que corresponde a los compuestos de fórmula (III)_S o (III)_E) o a los conectores de GalNAc L_{GAL} (lo que corresponde a los compuestos de fórmula (IV)_S o (IV)_E), y el átomo de nitrógeno del compuesto de fórmula (XV) está unido al conector del resto de saponina L_S o al conector del resto efector L_E.

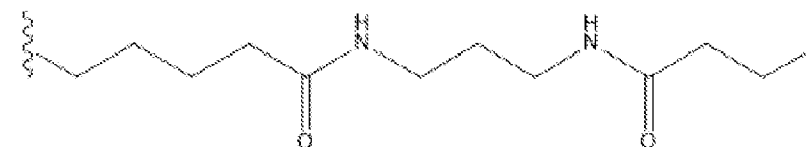
El experto entenderá que estos compuestos de fórmula (III)_S, (III)_E, (IV)_S o (IV)_E donde el resto que actúa como puente B es un compuesto de fórmula (XV) corresponden a los conjugados de molécula efectora donde el ligando de ASGPR consiste en (GalNAc)₃Tris.

Conjugados - conector L_{GAL}

Los conectores de GalNAc L_{GAL} representan cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente GalNAc al resto que actúa como puente como en la fórmula (IV)_S o (IV)_E. La identidad y el tamaño del conector no están particularmente limitados.

De acuerdo con algunas realizaciones, los conectores de GalNAc L_{GAL} comprenden cada uno 2-25 átomos de carbono, preferentemente 7-15 átomos de carbono, más preferentemente 11 átomos de carbono. Preferentemente,

los conectores de GalNAc_L comprenden al menos uno, preferentemente dos restos de amida. Un conector de GalNAc_L particularmente preferido es un compuesto de acuerdo con la fórmula (XVI):



(XVI)

Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, comprendida en el tercer conjugado, es un ligando para una molécula de la superficie celular o un anticuerpo que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular o al menos un dominio o fragmento de este que comprende el sitio de unión.

Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde el tercer conjugado es uno cualquiera o más de entre: un conjugado de anticuerpo-toxina, un conjugado de ligando para un receptor-toxina, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un conjugado de ligando para un receptor-fármaco, un conjugado de anticuerpo-ácido nucleico o un conjugado de ligando para un receptor-ácido nucleico.

Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, comprendida en el tercer conjugado, es capaz de unirse a una cualquiera de las moléculas de la superficie celular: CD71, CA125, EpCAM(17-1A), CD52, CEA, CD44v6, FAP, EGF-IR, integrina, sindecano-1, integrina vascular alfa-V beta-3, HER2, EGFR, CD20, CD22, receptor de folato 1, CD146, CD56, CD19, CD138, receptor de CD27L, PSMA, CanAg, integrina-alfaV, CA6, CD33, mesotelina, Cripto, CD3, CD30, CD239, CD70, CD123, CD352, DLL3, CD25, efrina A4, MUC1, Trop2, CEACAM5, CEACAM6, HER3, CD74, PTK7, Notch3, FGF2, C4.4A, FLT3, CD38, FGFR3, CD7, PD-L1, CTLA4, CD52, PDGFRA, VEGFR1, VEGFR2, receptor de asialoglucoproteína (ASGPR), preferentemente una cualquiera de entre: HER2, CD71, ASGPR y EGFR, más preferentemente CD71.

Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, donde la molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, comprendida en el tercer conjugado, es o comprende uno cualquiera de entre: un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal tal como un anticuerpo monoclonal humano, una IgG, una molécula que comprende o consiste en un anticuerpo de un solo dominio, al menos un dominio V_{HH}, preferible un V_H de camélido, un dominio de un receptor de antígeno nuevo de cadena pesada variable (V_{NAR}), un Fab, un scFv, un Fv, un dAb, un F(ab)₂ y un fragmento Fcab.

Un aspecto de la invención se refiere a la combinación farmacéutica de la invención o a la composición farmacéutica de la invención, para su uso como medicamento.

Un aspecto de la invención se refiere a la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o problema de salud en el que interviene un producto de expresión de uno cualquiera o más de los genes: apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, gen X del VHB, gen S del VHB, AAT y LDH.

Parte de la invención es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o problema de salud en el que interviene un producto de expresión del gen apoB. El producto de expresión del gen apoB es la lipoproteína apolipoproteína B (ApoB), presente como parte de LDL, lipoproteínas remanentes y Lp(a). Habitualmente, la enfermedad es una enfermedad cardiovascular, habitualmente relacionada con la acumulación y presencia de una placa aterosclerótica que involucra una o más de las ApoB que comprenden LDL, Lp(a) y lipoproteínas remanentes. Sorprendentemente, los inventores han establecido ahora un silenciamiento génico eficaz y mejorado de apoB mediante el tratamiento con un BNA-AON en combinación con un conjugado de un ligando para ASGPR, en la presente tri-GalNAc, y una saponina. La saponina, en la presente SO1861 a modo de ejemplo, es conocida por su actividad para facilitar el escape endosomal de una molécula que entra en el endosoma, p. ej., a través de la captación celular mediada por receptores. El silenciamiento del gen de apoB dio como resultado una reducción de los niveles de ARNm para expresar la proteína ApoB, una reducción del nivel de la proteína ApoB en plasma y niveles más bajos de LDL en plasma, después del tratamiento con la combinación terapéutica de un conjugado de AON que comprende GalNAc y

un conjugado de saponina que comprende GalNAc. El efecto de silenciamiento del gen se manifiesta a las 72 h después de una sola administración de la combinación de dichos dos conjugados, e incluso después de más de 10 días, p. ej., después de 14 días.

Una realización es la combinación farmacéutica de la invención o la composición farmacéutica de la invención, o la combinación farmacéutica o composición farmacéutica para su uso de la invención, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una infección vírica, hipercolesterolemia, hiperoxaluria primaria, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad hepática relacionada con AAT, porfiria hepática aguda, amiloidosis mediada por TTR, amiloidosis por TTR hereditaria (hATTR), enfermedad mediada por el complemento, infección por hepatitis B o una enfermedad autoinmunitaria.

Una realización es la combinación farmacéutica para su uso de la invención o la composición farmacéutica para su uso de la invención, donde la saponina es un derivado de saponina, preferentemente un derivado de QS-21 o un derivado de SO1861 de acuerdo con la invención.

Un aspecto de la invención se refiere a un método *in vitro* o *ex vivo* para transferir el segundo conjugado o el tercer conjugado de la invención desde el exterior de una célula hacia el interior de dicha célula, preferentemente transfiriendo posteriormente la molécula efectora comprendida en el segundo conjugado o el tercer conjugado de acuerdo con la invención al citosol de dicha célula, que comprende los pasos de:

- a) proporcionar una célula que exprese ASGPR en su superficie y donde el tercer conjugado se ha de transferir a la célula, la cual expresa la molécula de la superficie celular para la cual el tercer conjugado comprende una molécula de unión para unirse a dicha molécula de la superficie celular, seleccionándose la célula preferentemente entre una célula hepática, una célula infectada por un virus y una célula tumoral;
- b) proporcionar el segundo conjugado o el tercer conjugado de la invención, para transferirlo a la célula proporcionada en el paso a);
- c) proporcionar el conjugado de saponina de la invención;
- d) poner en contacto la célula del paso a) *in vitro* o *ex vivo* con el segundo conjugado o el tercer conjugado del paso b) y el conjugado de saponina del paso c), con lo que se efectúa la transferencia del segundo conjugado o el tercer conjugado desde el exterior de la célula hacia el interior dicha célula, y preferentemente con lo que se efectúa posteriormente la transferencia del segundo conjugado o el tercer conjugado al citosol de dicha célula, o preferentemente con lo que se efectúa posteriormente la transferencia de al menos la molécula efectora comprendida en el segundo conjugado o el tercer conjugado al citosol de dicha célula.

La presente invención se ha descrito anteriormente haciendo referencia a una serie de realizaciones ilustrativas. La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

EJEMPLOS Y REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Ejemplo 1. CD71-saporina + GalNAc trivalente-L-SO1861 4000 nM

GalNAc trivalente es un ligando dirigido que reconoce el receptor ASGPR1 y se une a él en los hepatocitos. Se produjo GalNAc trivalente (Figura 1 y Figura 8) y se conjugó SO1861-EMCH (lábil, de manera similar a la descrita en la Figura 2 y la Figura 4 para SO1861 sin derivatizar, donde SPT001 es sinónimo de SO1861) con GalNAc trivalente, con una DAR de 1 respecto al SO1861 unido, (GalNAc trivalente-SO1861). SO1861-EMCH se refiere a SO1861 donde el grupo aldehído se ha derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona SO1861-Ald-EMCH. El "GalNAc trivalente" tal como se representa en las Figuras 1 y 8 es un conjugado de (GalNAc)₃Tris típico adecuado para acoplarse a una molécula efectora o a saponina. Como control, SO1861-EMCH también se conjugó (lábil) con GalNAc monovalente (Figura 3), con una DAR 1 respecto al SO1861 unido, (GalNAc-SO1861). Se trataron células HepG2 (ASGPR1⁺; CD71⁺, Tabla A3) y Huh7 (ASGPR1^{+/+}; CD71⁺, Tabla A3) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-L-SO1861 ((GalNAc)₃-SO1861) y GalNAc-L-SO1861 (GalNAc-SO1861) en presencia y ausencia de CD71-saporina 10 pM (anticuerpo monoclonal OKT-9 que tiene como diana CD71 conjugado con la toxina proteica saporina). El tratamiento celular en ausencia de CD71-saporina muestra que el GalNAc trivalente-L-SO1861 ((GalNAc)₃-SO1861) (o GalNAc trivalente)) como compuesto único no es tóxico hasta 15 000 nM (Figura 9).

Las células HepG2 y Huh7 también se trataron con un intervalo de concentraciones de CD71-saporina en combinación con una concentración fija de 1000 nM o 4000 nM de GalNAc trivalente-SO1861 (DAR = 1 respecto al SO1861 unido). Se determinó que la toxina proteica dirigida medió la destrucción celular de las células que expresan ASGPR1/CD71 (HepG2 y Huh7). Esto puso de manifiesto una destrucción celular potente a concentraciones bajas de CD71-Saporina (CI₅₀ = 1 pM) en ambas líneas celulares, mientras que concentraciones equivalentes de CD71-

Saporina (CD71-SPRN), CD71-Saporina + GalNAc trivalente ((GalNAc)₃) 1000 nM o CD71-Saporina + GalNAc trivalente ((GalNAc)₃-SPT) 4000 nM, pudieron inducir la destrucción celular tan solo a concentraciones elevadas de CD71-Saporina (CI₅₀=100 pM) en ambas líneas celulares (Figura 10).

- 5 Todo esto muestra que GalNAc trivalente-SO1861 ((GalNAc)₃-SPT) en combinación con concentraciones bajas de CD71-Saporina (CD71-SPRN) inducen de forma eficaz la destrucción celular en células que expresan ASGPR1/CD71. Por tanto, GalNAc trivalente-SO1861 induce de forma eficaz el escape endosomal de una toxina proteica en células que expresan ASGPR1.

10 **Ejemplo 2** GalNAc trivalente-L/S-BNA + SO1861-EMCH

Se conjugó BNA de HSP27 con GalNAc trivalente (Figura 6-7) y se trataron células HepG2 (ASGPR1⁺) o Huh7 (ASGPR1^{+/−}) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-L-BNA de HSP27 (conjugación lábil, Figura 6) o GalNAc trivalente-S-BNA de HSP27 (conjugación estable, Figura 7) en combinación con una concentración fija de SO1861-EMCH 4000 nM. Se determinó el silenciamiento del gen HSP27 en las células HepG2 y Huh7. Solo se observó un silenciamiento eficaz del gen en combinación con SO1861-EMCH 4000 nM a concentraciones bajas de GalNAc trivalente-L-BNA de HSP27 (que también se denomina (GalNAc)₃-L-HSP27) (HepG2: CI₅₀ = 0,1 nM; Huh7: CI₅₀ = 3 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA de HSP27 (que también se denomina (GalNAc)₃-S-HSP27) (HepG2: CI₅₀ = 0,1 nM; Huh7: CI₅₀ = 3 nM) en ambas células HepG2 y Huh7, mientras que unas concentraciones equivalentes de GalNAc trivalente-L-BNA de HSP27 (HepG2/Huh7: CI₅₀ > 2000 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA de HSP27 (HepG2/Huh7: CI₅₀ > 2000 nM) no mostraron actividad de silenciamiento del gen en las líneas celulares HepG2 y Huh7 (Figura 11).

A continuación, se conjugó BNA de ApoB de manera similar (Figura 6-7) con GalNAc trivalente y se trataron células HepG2 (ASGPR1⁺) o Huh7 (ASGPR1^{+/−}) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB (que también se denomina (GalNAc)₃-L-ApoB) (conjugación lábil, Figura 6, Figura 12, Figura 13) o GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB (que también se denomina (GalNAc)₃-S-ApoB) (conjugación estable, Figura 7, Figura 14, Figura 15) o GalNAc trivalente-L-BNA_{aleatorizado} de ApoB (que también se denomina (GalNAc)₃-L-ApoB (Alea.) o GalNAc trivalente-S-BNA_{aleatorizado} de ApoB (que también se denomina (GalNAc)₃-L-ApoB (Alea.) (donde el BNA aleatorizado de ApoB es una secuencia oligomérica aleatorizada antisentido que no se une al ARNm de ApoB; es un BNA de control fuera de la diana) en combinación con una concentración fija de SO1861-EMCH (que también se denomina SPT-EMCH) 4000 nM. Se determinó el silenciamiento del gen ApoB en las células HepG2 (ASGPR1⁺) o Huh7 (ASGPR1^{+/−}) Solo se observó un silenciamiento eficaz del gen en combinación con SO1861-EMCH 4000 nM a concentraciones bajas de GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB (CI₅₀ = 10 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB (CI₅₀ = 10 nM) en células HepG2, mientras que unas concentraciones equivalentes de GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB (CI₅₀ > 2000 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB (CI₅₀ > 2000 nM) no mostraron actividad de silenciamiento del gen en células HepG2 (Figura 12, Figura 14). Los tratamientos no afectaron a la viabilidad de ninguna de las dos líneas celulares (Figura 13, Figura 15). La "L" se refiere a un conector "lábil", lo que indica que el conector se escinde en la célula, es decir, al pH que se manifiesta en el endosoma y el lisosoma. Por el contrario, la "S" se refiere a un conector "estable" (del inglés, Stable), lo que indica que el conector no se escinde en la célula, es decir, al pH que se manifiesta en el endosoma y el lisosoma. Por tanto, un conjugado que comprende un enlace lábil entre dos moléculas cualesquiera que forman el conjugado o comprendidas en el conjugado, se escindirá en una posición en el conector lábil, con lo que se disociarán las dos moléculas enlazadas o unidas. Un ejemplo es la escisión de un enlace de tipo hidrazona en condiciones ácidas tal como se manifiestan en el endosoma y lisosoma de células de mamífero tales como células humanas.

Todo esto muestra que SO1861-EMCH puede potenciar el escape endosomal y el silenciamiento del gen diana de GalNAc trivalente-L-BNA o GalNAc trivalente-S-BNA para dos dianas génicas independientes. El silenciamiento del gen es más eficaz en las células HepG2 en comparación con las células Huh7, lo que sugiere que unos niveles más altos de expresión de ASGPR1 en la membrana plasmática de la célula facilitan una mayor captación de los conjugados de GalNAc-BNA.

Ejemplo 3 GalNAc trivalente-L/S-BNA + GalNAc trivalente-L-SO1861

Se conjugó SO1861-EMCH (lábil, de manera similar a la descrita en la Figura 2 y la Figura 4 para SO1861 sin derivatizar (que también se denomina SPT001) con GalNAc trivalente, con una DAR = 1 respecto al SO1861 unido, (que se denomina GalNAc trivalente-SO1861 o (GalNAc)₃-SO1861 o (GN)₃-SPT). Se trataron células HepG2 (ASGPR1⁺) o Huh7 (ASGPR1^{+/−}) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB (conjugación lábil, Figura 16), GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB (conjugación estable (Figura 17) o los conjugados de control fuera de la diana aleatorizados (GalNAc trivalente-L-BNA_{aleatorizado} de ApoB o GalNAc trivalente-S-BNA_{aleatorizado} de ApoB) en combinación con una concentración fija de GalNAc trivalente-L-SO1861 (DAR = 1 respecto

al SO1861 unido) 4000 nM. Se determinó el silenciamiento del gen ApoB en las células HepG2 (ASGPR1⁺) y Huh7 (ASGPR1^{+/+}). Solo se observó un silenciamiento eficaz del gen en combinación con GalNAc trivalente-L-SO1861 ((GN)3-SPT) 4000 nM a concentraciones bajas de GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB (CI50 = 50 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB (CI50 = 50 nM) en células HepG2 (ASGPR1⁺). Ambos tratamientos combinados en células Huh7 (ASGPR1^{+/+}) mostraron un silenciamiento del gen menos eficaz (GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB: CI50 = 700 nM; GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB: CI50 = 700 nM). Unas concentraciones equivalentes de GalNAc trivalente-L-BNA de ApoB (HepG2/Huh7: CI50 > 1000 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA de ApoB (HepG2/Huh7: CI50 > 1000 nM) no mostraron actividad de silenciamiento del gen en las líneas celulares HepG2 y Huh7, y GalNAc trivalente-L-SO1861 4000 nM tampoco indujo/potenció el silenciamiento del gen por parte de GalNAc trivalente-L-BNA^{aleatorizado} de ApoB aleatorizado (HepG2/Huh7: CI50 > 1000 nM) o GalNAc trivalente-S-BNA^{aleatorizado} de ApoB (HepG2/Huh7: CI50 > 1000 nM) (Figura 16). T

Todo esto muestra que en combinación con GalNAc trivalente-L-SO1861 ((GN)3-SPT), unas concentraciones muy bajas de GalNAc trivalente-L-BNA de HSP27 o GalNAc trivalente-S-BNA de HSP27 inducen de forma eficaz el silenciamiento del gen en células que expresan ASGPR1, y de nuevo se observan efectos más potentes en células con una mayor expresión de ASGPR1.

Ejemplo 4 Potencia de (GalNAc)3-BNA y (GalNAc)3-SO1861 en hepatocitos primarios de ratón

Se conjugó (GalNAc)3 con un conector ("Ls") que mostraba SO1861-EMCH (GalNAc)3-SO1861, con una DAR = 1 para el SO1861 unido (FIG. 25, 26). A continuación, un BNA que tenía como diana una secuencia de ApoB de murino, más específicamente BNA^{NC} de ApoB#02 o BNA de tiol-13-ApoB o ApoB#02, se conjugó con un conector ("Ls") para obtener (GalNAc)3-ApoB#02 con una DAR = 1 para el SO1861 unido (FIG. 27, 28).

Se trataron hepatocitos primarios de ratón con un intervalo de concentraciones de o bien BNA de ApoB#02 solo, o (GalNAc)3-ApoB#02, o (GalNAc)3-ApoB#02 + SO1861-EMCH 2000 nM, o (GalNAc)3-ApoB #02 + (GalNAc)3-SO1861 250 nM y se determinó la expresión del ARN de ApoB mediante qPCR después de 72 h de incubación (Figura 18). Solo se observó una modulación a la baja eficaz de la expresión del ARNm de ApoB, es decir, una inhibición de la expresión del gen, en combinación con SO1861-EMCH 2000 nM o en combinación con (GalNAc)3-SO1861 250 nM, a concentraciones bajas de (GalNAc)3-BNA de ApoB#02; CI50 de aprox. 0,03 nM en combinación con SO1861-EMCH 2000 nM, y CI50 de aprox. 0,2 nM en combinación con (GalNAc)3-SO1861 250 nM. El tratamiento con BNA de ApoB#02 solo fue aproximadamente 100 – 667 veces menos potente en la modulación a la baja del ARN de ApoB (ApoB#02: CI50 = 20 nM), mientras que (GalNAc)3-ApoB#02 con una CI50 de aprox. 2 nM fue aproximadamente 10 - 67 veces menos potente.

Esto muestra que solo en combinación con (GalNAc)3-SO1861 o SO1861-EMCH, unas concentraciones muy bajas de (GalNAc)3-BNA de ApoB#02 inducen de forma eficaz una modulación a la baja del ARN de ApoB, es decir, el silenciamiento del gen en hepatocitos primarios de murino.

Ejemplo 5 Eficacia *in vivo* de (GalNAc)3-BNA + (GalNAc)3-SO1861 en ratones C57BL/6J

Se trataron ratones C57BL/6J tal como se describe y se les administraron dosis de acuerdo con la Tabla A5. Los conjugados utilizados en este estudio, (GalNAc)3-ApoB#02 y (GalNAc)3-SO1861, se produjeron tal como se describe en la Figura 25-28. Se registraron las observaciones clínicas y se analizaron diferentes biomarcadores de eficacia y tolerabilidad.

Tal como muestra la Figura 19, después de 24 h, los niveles de ARN de ApoB, es decir, la expresión del gen, no se redujo notablemente en los animales tratados con 0,1 mg/kg de BNA de ApoB#02 (ApoB#02), y se redujo aproximadamente un 15 % y un 21 % en los grupos que recibieron dosis de 1 mg/kg o 2 mg/kg de BNA de ApoB#02, respectivamente (en todos los casos, n = 3 animales por grupo), en comparación con el grupo que recibió dosis de vehículo (n = 5 animales). Asimismo, (GalNAc)3-ApoB#02, con una dosis de 1 mg/kg (correspondiente a 0,58 mg/kg BNA de ApoB#02) redujo la expresión de ApoB en aproximadamente un 53 % (n = 3 animales) en comparación con el control de vehículo después de 24 h, mientras que 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 por sí solo no mostró ninguna reducción notable (n = 3) en comparación con el vehículo. Por el contrario, cuando se coadministraron 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, la expresión de ApoB se redujo rápidamente en aproximadamente un 69 % (n = 2 animales) después de tan solo 24 h; mientras que 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02, cuando se coadministraron con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, siguieron mostrando una pequeña reducción de un 16 % (n = 2 animales), en comparación con el vehículo. Después de 72 h, la dosis más alta de BNA de ApoB#02 administrada (2 mg/kg) mostró una reducción máxima de un 39 % (n = 3 animales) en comparación con el vehículo (n = 5 animales), mientras que 1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 dio como resultado una reducción de un 68 % de la expresión de ApoB (n = 3 animales). Por el contrario, de nuevo la dosis 10 veces menor de 0,1 mg/kg de

(GalNAc)3-ApoB#02, cuando se coadministró con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, dio como resultado una reducción de incluso un 82 % de los niveles de expresión de *ApoB* (n = 3 animales), mientras que 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 por sí solo muestran tan solo una reducción de un 12 % (n = 3 animales). El efecto fue duradero y, después de 336 h, los niveles de expresión de *ApoB* se redujeron en un 30 % para 2 mg/kg de BNA de ApoB#2 (n = 2 animales) y en un 25 % para 1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02. El grupo de coadministración de 10 veces menos de carga útil (es decir, 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861) sigue mostrando una reducción de un 25 % y, por lo tanto, constituye una mejora de 10 veces de la reducción de la expresión de *ApoB* basada en la carga útil administrada.

Tal como muestra la Figura 20, la modulación a la baja del ARN de *ApoB* (que se muestra en la Figura 19) se tradujo bien al nivel de proteína *ApoB*. Después de 24 h, los niveles de proteína *ApoB* se redujeron de la forma más notable en aprox. un 50 % para ambos casos, el de 1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 (n = 8 animales) e igualmente para el grupo de coadministración con 10 veces menos (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, es decir, 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861 (n = 8 animales), en comparación con los controles (n = 14 animales). Después de 72 h, aunque todos los grupos de tratamiento mostraron una reducción en la proteína *ApoB*, en comparación con los controles de vehículo, el efecto más pronunciado se observó únicamente cuando se coadministraron 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, lo que dio como resultado una reducción de *ApoB* de aprox. un 90 % (n = 5 animales). Incluso 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 redujeron la proteína *ApoB* en aprox. un 25 % cuando se coadministraron con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861 (n = 4 animales), mientras que la dosis 10 veces mayor de 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 por sí sola redujo la proteína *ApoB* en un 35 % (n = 5 animales) después de 72 h tras la dosis. De nuevo, el efecto fue duradero y la reducción de la proteína *ApoB* aún se podía observar a las 336 h para todos los grupos de tratamiento analizados (en todos los casos n = 2 animales por grupo; no se analizaron muestras de los grupos de 1 mg/kg de ApoB#02 ni 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861a las 336 horas). También en este caso, 1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 y el grupo de coadministración de la dosis 10 veces menor de 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861 mostraron una durabilidad similar (reducción de un 23 % en la proteína *ApoB* después de 336 h).

Tal como muestra la Figura 21, la modulación a la baja de la proteína *ApoB* observada (que se muestra en la Figura 20) se tradujo bien en los niveles de colesterol LDL (LDL-C). Después de 24 h, los niveles de LDL-C no se redujeron notablemente en los animales tratados con 0,1, 1 o 2 mg/kg de BNA de ApoB#02 (n = 3 animales por grupo) en comparación con el vehículo (n = 6 animales). El complejo de (GalNAc)3-ApoB#02 dirigido con una dosis de 1 mg/kg redujo LDL-C hasta un promedio de 2,7 mg/dl en tan solo 24 h (n = 3 animales), es decir, una reducción de un 53 % en comparación con los grupos de vehículo y de BNA de ApoB#02. La misma reducción de LDL-C hasta un promedio de 2,7 mg/dl en 24 h (n = 3 animales), es decir, una reducción de un 53 %, ya se observó con una dosis 10 veces menor de 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 cuando se coadministró con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, mientras que el grupo de 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861 presentó una variación demasiado grande para llegar a ninguna conclusión (n = 2 animales). Después de 72 h, la dosis más alta de BNA de ApoB#02 (2 mg/kg) mostró una reducción de un 50 % (n = 3 animales) en LDL-C en comparación con el vehículo (n = 6 animales), mientras que 1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 presentó una reducción de un 72 % (n = 3 animales) y la dosis 10 veces menor de 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861 presentó una reducción de incluso un 78 % (n = 3 animales); mientras que 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861 presentó una reducción de un 13 % (n = 2 animales). El efecto fue duradero y, después de 336 h, los niveles de LDL-C se redujeron en un 40 % con 2 mg/kg de BNA de ApoB#02, y en un 48 % con 1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 y para el grupo de coadministración de 0,1 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, se observó una mejora de 10 veces en la reducción de LDL-C basada en la carga útil administrada.

Como conclusión, esto muestra que solo en combinación con 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, unas concentraciones muy bajas de GalNAc trivalente-BNA de ApoB#02 ((GalNAc)3-BNA de ApoB#02) inducen de forma eficaz la modulación a la baja del ARN de *ApoB*, es decir, el silenciamiento del gen en los hígados de ratones C57BL/6J y de todos los biomarcadores de eficacia "posteriores", tales como la proteína *ApoB* y el colesterol LDL.

Ejemplo 5 Tolerabilidad in vivo de (GalNAc)3-BNA + (GalNAc)3-SO1861 en ratones C57BL/6J

Los conjugados utilizados en este estudio, (GalNAc)3-ApoB#02 y (GalNAc)3-SO1861, se produjeron tal como se describe en la Figura 25-28.

Durante el curso del estudio, todos los tratamientos, dosis y pautas posológicas tal como se describen en la Tabla A5 fueron bien tolerados y no mostraron hallazgos adversos específicos del tratamiento ni ningunas observaciones clínicas específicas que indicaran que los conjugados no se toleraban. Los ratones en los grupos de tratamiento

ganaron un peso comparable al de los ratones que recibieron el vehículo. Se determinaron los niveles de ALT en suero y los resultados se muestran en la Figura 22. Durante el período del estudio, los niveles de ALT para los ratones que recibieron vehículo variaron de un promedio de 47 a 61 U/L por grupo (n = 6 animales por vehículo). Los niveles de ALT aumentaron transitoriamente en los diferentes grupos de dosis en diferentes puntos de evaluación, en ocasiones con una gran variación por animal y por grupo, sin mostrar ninguna correlación específica con el compuesto o la dosis (n = 3 para todos los grupos a las 24 h y 72 h, respectivamente, excepto para 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#02 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO1861, donde n = 2 para ambos puntos de evaluación). Cabe destacar que, después de 336 h, los niveles de ALT en todos los grupos de dosificación volvieron a la línea de base y fueron comparables a los controles de vehículo (n = 2 para todos los grupos).

Como conclusión, esto muestra que ApoB#02, (GalNAc)3-ApoB#02 y (GalNAc)3-SO1861 (solos o en combinación con (GalNAc)3-ApoB#02) son bien tolerados en las dosis y las pautas posológicas aplicadas, y en particular, que la coadministración de (GalNAc)3-SO1861 con (GalNAc)3-ApoB#02 no presenta problemas de tolerabilidad inmediatos, a la vez que muestra una alta potencia en el modelo de ratón C57BL/6J.

Ejemplo 6. *(GalNAc)3-SO1861 + CD71-saporina 10 pM y (GalNAc)3-BNA + (GalNAc)3-SO1861 250 nM*

Se conjugó SO1861-EMCH (lábil, de manera similar a la descrita en la Figura 2 y la Figura 4 para SO1861 sin derivatizar) con GalNAc trivalente ((GalNAc)3), con una DAR = 1 para el SO1861 unido, que se denomina (GalNAc)3-SO1861. SO1861-EMCH se refiere a SO1861 donde el grupo aldehído se ha derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona SO1861-Ald-EMCH. El "GalNAc trivalente" tal como se representa en las Figuras 1 y 8 es un conjugado de (GalNAc)₃Tris típico adecuado para acoplarse a una molécula efectora o a saponina. Se trataron hepatocitos primarios humanos con un intervalo de concentraciones de SO1861 (sin derivatizar) o (GalNAc)3-SO1861 en presencia y ausencia de CD71-saporina (clon del anticuerpo monoclonal OKT-9 que tiene como diana CD71 conjugado con la toxina proteica saporina) 10 pM (concentración no eficaz) (Figura 23). Esto puso de manifiesto que la destrucción celular eficaz mediada por CD71-saporina de hepatocitos primarios humanos fue eficaz con SO1861 de CI50 = 200 nM, mientras que el conjugado (GalNAc)3-SO1861 dirigido ya era eficaz en concentraciones mucho más bajas (SO1861 de CI50 = 10 nM) (Figura 23). Todo esto puso de manifiesto que el suministro mediado por el receptor ASGPR1 de SO1861 (EMCH) conjugado, escindible y sensible al ácido requiere cantidades reducidas de SO1861 para manifestar una potencia mejorada.

A continuación, se conjugó BNA de ApoB (SEQ ID NO: 2) con GalNAc trivalente ((GalNAc)3) para producir (GalNAc)3-BNA de ApoB (Figura 6) y se evaluó en combinación con SO1861-EMCH 2000 nM o (GalNAc)3-SO1861 250 nM en hepatocitos primarios humanos para determinar la modulación de la expresión del ARN de ApoB (Figura 24A) así como la viabilidad celular (Figura 24B). Esto puso de manifiesto que (GalNAc)3-BNA de ApoB por sí solo no fue capaz de reducir de forma eficaz la expresión del ARN de ApoB (CI50 > 1000 nM) (Figura 24 A), y no se observaron efectos sobre la viabilidad celular (Figura 24 B). Sin embargo, (GalNAc)3-BNA de ApoB + SO1861-EMCH 2000 nM fue muy eficaz y mostró una reducción potente de la expresión del ARN de ApoB a concentraciones bajas de (GalNAc)3-BNA de ApoB (CI50 = 8 nM; Figura 24 A) y se observó una reducción de la viabilidad celular para CI50 = 600 nM (Figura 24 B). (GalNAc)3-BNA de ApoB + (GalNAc)3-SO1861 250 nM también mostró una reducción potente del ARN de ApoB a concentraciones bajas de (GalNAc)3-BNA de ApoB (CI50 = 15 nM; Figura 24 A) sin afectar significativamente a la viabilidad celular (Figura 24 B). Curiosamente, en la combinación de (GalNAc)3-BNA de ApoB + (GalNAc)3-SO1861 250 nM, por encima de una concentración 100 nM de (GalNAc)3-BNA de ApoB, se observó una competencia de los conjugados de (GalNAc)3 por la unión al receptor ASGPR1, lo que limita las concentraciones óptimas de ambos conjugados para acceder a la célula, revirtiendo así la reducción de la expresión del ARN de ApoB.

Ejemplo 7. *CD71-saporina + serie de concentraciones de GalNAc trivalente-L-SO1861, GalNAc trivalente-(L-SO1861)4, SO1861-EMCH*

Se produjo GalNAc trivalente (Figura 1 y Figura 8) y se conjugó SO1861-EMCH (lábil, de manera similar a la descrita en la Figura 2 y la Figura 4 para SO1861 sin derivatizar, donde SPT y SPT001 son sinónimos de SO1861) con GalNAc trivalente, con una DAR = 1 respecto al SO1861 unido, (GalNAc trivalente-SO1861; (GN)3-SPT) o con una DAR = 4 acoplando en primer lugar SO1861-EMCH con un dendrón (GalNAc trivalente-dendrón(SO1861)4; (GN)3-dSPT4; Figura 33C). De nuevo, SO1861-EMCH se refiere a SO1861 donde el grupo aldehído se ha derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona SO1861-Ald-EMCH. El "GalNAc trivalente" tal como se representa en las Figuras 1 y 8 es un conjugado de (GalNAc)₃Tris típico adecuado para acoplarse a una molécula efectora o a saponina. Como control, SO1861-EMCH también se conjugó (lábil) con GalNAc monovalente (Figura 3), con una DAR = 1 respecto al SO1861 unido o con una DAR = 4 respecto al SO1861 unido (utilizando un dendrón),

(GalNAc-SO1861 y GalNAc-(SO1861)₄). Los hepatocitos primarios expresan el receptor con una densidad elevada, lo que hace posible que actúe como diana. Se trataron hepatocitos primarios con una expresión elevada de ASGPR1 (ASGPR1) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-L-SO1861, SO1861-EMCH, GalNAc trivalente-(SO1861)₄ en presencia de CD71-saporina (anticuerpo monoclonal OKT-9 que tiene como diana CD71 conjugado con la toxina proteica saporina) 10 pM. El tratamiento celular en ausencia de CD71-saporina muestra que GalNAc trivalente-L-SO1861 como compuesto único no es tóxico hasta al menos 1000 nM (Figura 29A; viabilidad celular relativa). La viabilidad celular de las células tratadas con la combinación de MoAb anti-CD71-saporina ("MoAb" = anticuerpo monoclonal) y GalNAc conjugado con SO1861 (DAR = 1 respecto al SO1861 unido, o DAR = 4 respecto al SO1861 unido) es aproximadamente un factor 100 más bajo en comparación con la viabilidad celular de las células tratadas con MoAb anti-CD71-saporina (CD71-SPRN) en combinación con SO1861-EMCH (SPT-EMCH) (Figura 29A).

Todo esto muestra que GalNAc trivalente-SO1861 y GalNAc trivalente-(SO1861)₄ en combinación con concentraciones bajas de CD71-Saporina inducen de forma eficaz la destrucción celular en células que expresan ASGPR1/CD71. Por tanto, GalNAc trivalente-SO1861 induce de forma eficaz el escape endosomal de una toxina proteica en células que expresan ASGPR1. Por lo tanto, SPT001 y SPT001 dirigido por GalNAc (DAR = 1 respecto al SO1861 unido) aumentan ambos la potencia de un ASO dirigido por GalNAc estándar en la industria; SO1861-EMCH con aproximadamente un factor de 10, y tanto (GN)3-SPT como (GN)3-dSPT4 aproximadamente 100x, cuando se considera la viabilidad celular de las células hepáticas.

Ejemplo 8. GalNAc trivalente conjugado con un oligonucleótido antisentido de ApoB + GalNAc trivalente-L-SO1861

Se produjo GalNAc trivalente (Figura 1 y Figura 8) y se conjugó SO1861-EMCH (lábil, de manera similar a la descrita en la Figura 2 y la Figura 4 para SO1861 sin derivatizar, donde SPT y SPT001 son sinónimos de SO1861) con GalNAc trivalente, con una DAR de 1 (GalNAc trivalente-SO1861; (GalNAc)₃-SPT001; Figura 30C). De nuevo, SO1861-EMCH se refiere a SO1861 donde el grupo aldehído se ha derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona SO1861-Ald-EMCH. Además, se preparó el conjugado covalente de GalNAc trivalente acoplado tanto con el oligonucleótido BNA antisentido de ApoB BNA de ApoB (SEQ ID NO: 2) como con un dendrón que comprendía cuatro SO1861-EMCH acoplados covalentemente. Para consultar las generalidades sobre la preparación de los conjugados, véase también la sección "**Síntesis de GalNAc trivalente-SO1861 y GalNAc-SO1861 (Figura 2, 4)**" y la sección "**Síntesis de GalNAc trivalente-oligo BNA (Figura 6, 7)**" y las secciones "**Síntesis de GalNAc trivalente-S-oligo BNA de ApoB (o HSP27)**" y "**Síntesis de GalNAc trivalente-L-oligo BNA de ApoB (o HSP27)**" y la sección "**Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente**", más adelante en la presente.

Se trataron hepatocitos primarios con una expresión elevada de ASGPR1 (ASGPR1⁺) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-BNA de ApoB ((GalNAc)₃-ApoB), en presencia o no de GalNAc trivalente-SO1861 ((GalNAc)₃-SPT001) (Figura 29B) 300 nM. El tratamiento celular en ausencia de (GalNAc)₃-SPT001 muestra que GalNAc trivalente-L-SO1861 es muy eficaz para reducir la expresión del gen ApoB en los hepatocitos primarios en comparación con la expresión del gen ApoB en células tratadas solo con (GalNAc)₃-ApoB (Figura 29B).

Todo esto muestra que GalNAc trivalente-SO1861 en combinación con (GalNAc)₃-ApoB induce de forma eficaz el silenciamiento de la expresión del gen ApoB en células que expresan ASGPR1. Por tanto, GalNAc trivalente-SO1861 induce de forma eficaz el escape endosomal de un BNA en células que expresan ASGPR1.

Ejemplo 9. GalNAc trivalente conjugado con SO1861, o una serie de concentraciones del conjugado GalNAc trivalente(-L-SO1861) en presencia de una dosis fija del anticuerpo monoclonal anti-CD71 OKT-9

Se produjo GalNAc trivalente (Figura 1 y Figura 8) y se conjugó SO1861-EMCH (lábil, de manera similar a la descrita en la Figura 2 y la Figura 4 para SO1861 sin derivatizar, donde SPT y SPT001 son sinónimos de SO1861) con GalNAc trivalente, con una DAR = 1 respecto al SO1861 unido (GalNAc trivalente-SO1861; (GalNAc)₃-SPT001; Figura 30C). De nuevo, SO1861-EMCH se refiere a SO1861 donde el grupo aldehído se ha derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona SO1861-Ald-EMCH. Para consultar las generalidades sobre la preparación del conjugado, véase también la sección "**Síntesis de GalNAc trivalente-SO1861 y GalNAc-SO1861 (Figura 2, 4)**" más adelante en la presente.

Se trataron hepatocitos primarios con una expresión elevada de ASGPR1 (ASGPR1⁺) y células de hepatocitos de la línea celular Huh7 (ASGPR1^{+/+}) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-SO1861 (GalNAc trivalente-SPT001), en presencia o no de CD71-saporina (anticuerpo monoclonal OKT-9 que tiene como diana CD71

conjugado con la toxina proteica saporina; Figura 30D) 10 pM. El tratamiento celular en ausencia de CD71-saporina muestra que GalNAc trivalente-L-SO1861 como compuesto único no es tóxico hasta al menos 1000 nM (Figura 30A, 30B; viabilidad celular relativa). La viabilidad celular de las células tratadas con la combinación de MoAb anti-CD71-saporina y una dosis nM baja de GalNAc conjugado con SO1861 (DAR = 1 respecto al SO1861 unido; GalNAc trivalente-SPT001) es muy eficaz para destruir los hepatocitos primarios en comparación con la viabilidad celular de células Huh7 tratadas con la misma dosis de MoAb anti-CD71-saporina (CD71-saporina) combinada con la misma dosis de GalNAc trivalente-SPT001 (Figura 30A y 30B).

Todo esto muestra que una dosis baja de GalNAc trivalente-SO1861 en combinación con una concentración baja de CD71-Saporina induce de forma eficaz la destrucción celular en células que expresan ASGPR1. Por tanto, GalNAc trivalente-SO1861 induce de forma eficaz el escape endosomal de una toxina proteica en células que expresan ASGPR1. Por tanto, GalNAc trivalente-SPT001 con una concentración nM baja potencia el suministro citoplasmático de MoAbCD71-saporina con una concentración pM baja en hepatocitos primarios; y los hepatocitos que carecen de expresión de ASGPR1 no responden a concentraciones nM bajas de GalNAc trivalente-SPT001.

Ejemplo 10. GalNAc trivalente conjugado con un oligonucleótido antisentido de ApoB + GalNAc trivalente-L-SO1861

Se produjo GalNAc trivalente y se conjugó SO1861-EMCH con GalNAc trivalente, con una DAR = 1 respecto al SO1861 unido, tal como se describe en el Ejemplo 8 (GalNAc trivalente-SO1861; (GalNAc)₃-SPT001); Figura 30C). Además, se preparó el conjugado de GalNAc trivalente y el oligonucleótido BNA antisentido de ApoB BNA de ApoB (SEQ ID NO: 2) (Figura 31C). Para consultar las generalidades sobre la preparación de los conjugados, véase también la sección "**Síntesis de GalNAc trivalente-SO1861 y GalNAc-SO1861 (Figura 2, 4)**" y la sección "**Síntesis de GalNAc trivalente-oligo BNA (Figura 6, 7)**" y las secciones "**Síntesis de GalNAc trivalente-S-oligo BNA de ApoB (o HSP27)**" y "**Síntesis de GalNAc trivalente-L-oligo BNA de ApoB (o HSP27)**" y la sección "**Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente y dendrón(-L-SO1861)₈-GalNAc trivalente**" y "**Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente**", más adelante en la presente.

Se trataron hepatocitos primarios con una expresión elevada de ASGPR1 (ASGPR1⁺) y células de hepatocitos de la línea celular Huh7 (ASGPR1^{+/+}) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-BNA de ApoB (GalNAc trivalente-BNA de ApoB), en presencia o no de GalNAc trivalente-SO1861 (GalNAc trivalente-SPT001) 300 nM (Figura 31A y B). El tratamiento celular en ausencia de GalNAc trivalente-SPT001 muestra que GalNAc trivalente-SPT001 es muy eficaz (~ factor de 100 más potente) para reducir la expresión del ARNm de ApoB en los hepatocitos primarios en comparación con la expresión del ARNm de ApoB en las células hepáticas primarias tratadas con GalNAc trivalente-BNA de ApoB por sí solo (Figura 31A). Ni GalNAc trivalente-BNA de ApoB, ni la combinación de GalNAc trivalente-BNA de ApoB y GalNAc trivalente-SPT001 inducen la reducción de la expresión del ARNm de ApoB en estas células hepáticas.

Todo esto muestra que GalNAc trivalente-SPT001 en combinación con GalNAc trivalente-BNA de ApoB induce de forma eficaz el silenciamiento de la expresión del ARNm de ApoB en células que expresan ASGPR1. Por tanto, GalNAc trivalente-SPT001 induce de forma eficaz el escape endosomal de un BNA en células que expresan ASGPR1. Se trataron hepatocitos primarios con una expresión elevada de ASGPR1 (ASGPR1⁺) y células de hepatocitos de la línea celular Huh7 (ASGPR1^{+/+}) con un intervalo de concentraciones de GalNAc trivalente-BNA de ApoB (GalNAc trivalente-BNA de ApoB), en presencia o no de GalNAc trivalente-SO1861 (GalNAc trivalente-SPT001) 300 nM (Figura 32A y B), y se evaluó y comparó la expresión de la proteína ApoB. El tratamiento celular en ausencia de GalNAc trivalente-SPT001 muestra que GalNAc trivalente-SPT001 es muy eficaz (con un factor por encima de 1000 veces más potente) para reducir la expresión de la proteína ApoB en los hepatocitos primarios en comparación con la expresión de la proteína ApoB en las células hepáticas primarias tratadas con GalNAc trivalente-BNA de ApoB por sí solo (Figura 32A). Ni GalNAc trivalente-BNA de ApoB, ni la combinación de GalNAc trivalente-BNA de ApoB y GalNAc trivalente-SPT001 inducen la reducción de la expresión de la proteína ApoB en estas células hepáticas (Figura 32 B).

Todo esto muestra que GalNAc trivalente-SPT001 en combinación con GalNAc trivalente-BNA de ApoB induce de forma eficaz el silenciamiento de la expresión de la proteína ApoB en células que expresan ASGPR1. Por tanto, GalNAc trivalente-SPT001 induce de forma eficaz el escape endosomal de un BNA en células que expresan ASGPR1. Por tanto, GalNAc trivalente-BNA de ApoB + GalNAc trivalente-SPT001 con una concentración nM baja puede potenciar el escape endosomal y el suministro citoplasmático de BNA de ApoB, lo que da como resultado el silenciamiento del ARNm de ApoB en hepatocitos primarios; GalNAc trivalente-BNA de ApoB + GalNAc trivalente-SPT001 con una concentración nM baja puede potenciar el escape endosomal y el suministro citoplasmático de BNA de ApoB, lo que da como resultado la descomposición de la proteína ApoB en los hepatocitos primarios; las células con una expresión baja de ASGPR1 no responden a la terapia cuando se considera la expresión de ApoB.

Materiales y métodos**Abreviaturas**

5	AEM	Sal de tipo trifluoroacetato de la <i>N</i> -(2-aminoetil)maleimida
	AMPD	2-Amino-2-metil-1,3-propanodiol
	BOP	Hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio
	DIPEA	N,N-diisopropiletilamina
	DMF	N,N-dimetilformamida
10	EDCI.HCl	Cloruro de 3-((etilimino)metilenamino)-N,N-dimetilpropan-1-amonio
	EMCH.TFA	Sal del ácido trifluoroacético y la hidrazida del ácido N-(ε-maleimidocaproico)
	HATU	Hexafluorofosfato del 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metilen]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio
	Min	minutos
	NMM	4-Metilmorfolina
15	t _R	tiempo de retención
	TCEP	clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina
	Temp	temperatura
	TFA	ácido trifluoroacético

20 Métodos analíticosMétodo de LC-MS 1

25 Aparato: Waters IClass; Bin. Bomba: UPIBSM, SM: UPISMFTN con SO; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, intervalos de masa en función del peso molecular del producto: neg o neg/pos dentro de un intervalo de 1500-2400 o 2000-3000; ELSD: presión de gas de 40 psi, temperatura del tubo de deriva: 50 °C; columna: Acquity C18, 50×2,1 mm, 1,7 μm Temp: 60 °C, Flujo: 0,6 mL/min, Gradiente lin. en función de la polaridad del producto:

30 $A_{t_0} = 2\%$ de A, $t_{5,0min} = 50\%$ de A, $t_{6,0min} = 98\%$ de A

$B_{t_0} = 2\%$ de A, $t_{5,0min} = 98\%$ de A, $t_{6,0min} = 98\%$ de A

Tiempo posterior: 1,0 min, Eluyente A: acetonitrilo, Eluyente B: bicarbonato de amonio 10 mM en agua (pH = 9,5).

35 Método de LC-MS 2

40 Aparato: Waters IClass; Bin. Bomba: UPIBSM, SM: UPISMFTN con SO; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, intervalos de masa en función del peso molecular del producto: pos/neg 100-800 o neg 2000-3000; ELSD: presión de gas de 40 psi, temp. del tubo de deriva: 50 °C; columna: Waters XSelect™ CSH C18, 50×2,1 mm, 2,5 μm, Temp.: 25 °C, Flujo: 0,5 mL/min, Gradiente: $t_{0min} = 5\%$ de A, $t_{2,0min} = 98\%$ de A, $t_{2,7min} = 98\%$ de A, Tiempo posterior: 0,3 min, Eluyente A: acetonitrilo, Eluyente B: bicarbonato de amonio 10 mM en agua (pH = 9,5).

45 Método de LC-MS 3

50 Aparato: Waters IClass; Bin. Bomba: UPIBSM, SM: UPISMFTN con SO; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, intervalos de masa en función del peso molecular del producto: pos/neg 105-800, 500-1200 o 1500-2500; ELSD: presión de gas de 40 psi, temp. del tubo de deriva: 50 °C; columna: Waters XSelect™ CSH C18, 50×2,1 mm, 2,5 μm, Temp. 40 °C, Flujo: 0,5 mL/min, Gradiente: $t_{0min} = 5\%$ de A, $t_{2,0min} = 98\%$ de A, $t_{2,7min} = 98\%$ de A, Tiempo posterior: 0,3 min, Eluyente A: ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo, Eluyente B: ácido fórmico al 0,1 % en agua.

Método de LC-MS 4

55 Aparato: Waters IClass; Bin. Bomba: UPIBSM, SM: UPISMFTN con SO; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, intervalos de masa en función del peso molecular del producto: pos/neg 100-800 o neg 2000-3000; ELSD: presión de gas de 40 psi, temp. del tubo de deriva: 50 °C; columna: Waters Acquity Shield RP18, 50×2,1 mm, 1,7 μm, Temp.: 25 °C, Flujo: 0,5 mL/min, Gradiente: $t_{0min} = 5\%$ de A, $t_{2,0min} = 98\%$ de A, $t_{2,7min} = 98\%$ de A, Tiempo posterior: 0,3 min, Eluyente A: acetonitrilo, Eluyente B: bicarbonato de amonio 10 mM en agua (pH = 9,5).

60 Método de LC-MS 5

ES 3 002 193 T3

Aparato: Waters IClass; Bin. Bomba: UPIBSM, SM: UPISMFTN con SO; UPCMA, PDA: UPPDATC, 210-320 nm, SQD: ACQ-SQD2 ESI, intervalos de masa: pos/neg 1500-2500; ELSD: presión de gas de 40 psi, temp. del tubo de deriva: 50 °C; columna: Waters XSelect™ CSH C18, 50×2,1 mm, 2,5 µm, Temp. 25 °C, Flujo: 0,6 mL/min, Gradiente: $t_{0min} = 5\%$ de A, $t_{1,3min} = 98\%$ de A, $t_{1,7min} = 98\%$ de A, Tiempo posterior: 0,3 min, Eluyente A: acetonitrilo, Eluyente B: bicarbonato de amonio 10 mM en agua (pH = 9,5).

Métodos preparativos

10 Método preparativo de MP-LC 1

Tipo de instrumento: MPLC prep Reveleris™; columna: Waters XSelect™ CSH C18 (145×25 mm, 10 µm); Flujo: 40 mL/min; Temp. de la columna: temperatura ambiente; Eluyente A: bicarbonato de amonio 10 mM en agua de pH = 9,0; Eluyente B: 99 % de acetonitrilo + 1 % de bicarbonato de amonio 10 mM en agua; Gradiente:

$A_{t_{0min}} = 5\%$ de B, $t_{1min} = 5\%$ de B, $t_{2min} = 10\%$ de B, $t_{17min} = 50\%$ de B, $t_{18min} = 100\%$ de B, $t_{23min} = 100\%$ de B

$A_{t_{0min}} = 5\%$ de B, $t_{1min} = 5\%$ de B, $t_{2min} = 20\%$ de B, $t_{17min} = 60\%$ de B, $t_{18min} = 100\%$ de B, $t_{23min} = 100\%$ de B

20 ; Detección UV: 210, 235, 254 nm y ELSD.

Método preparativo de MP-LC 2

25 Tipo de instrumento: MPLC prep Reveleris™; Columna: Phenomenex LUNA C18(3) (150×25 mm, 10 µm); Flujo: 40 mL/min; Temp. de la columna: temperatura ambiente; Eluyente A: ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua, Eluyente B: ácido fórmico al 0,1% (v/v) en acetonitrilo, Gradiente:

$A_{t_{0min}} = 5\%$ de B, $t_{1min} = 5\%$ de B, $t_{2min} = 20\%$ de B, $t_{17min} = 60\%$ de B, $t_{18min} = 100\%$ de B, $t_{23min} = 100\%$ de B

30 $B_{t_{0min}} = 2\%$ de B, $t_{1min} = 2\%$ de B, $t_{2min} = 2\%$ de B, $t_{17min} = 30\%$ de B, $t_{18min} = 100\%$ de B, $t_{23min} = 100\%$ de B

$C_{t_{0min}} = 5\%$ de B, $t_{1min} = 5\%$ de B, $t_{2min} = 10\%$ de B, $t_{17min} = 50\%$ de B, $t_{18min} = 100\%$ de B, $t_{23min} = 100\%$ de B

35 $D_{t_{0min}} = 5\%$ de B, $t_{1min} = 5\%$ de B, $t_{2min} = 5\%$ de B, $t_{17min} = 40\%$ de B, $t_{18min} = 100\%$ de B, $t_{23min} = 100\%$ de B

; Detección UV: 210, 235, 254 nm y ELSD.

Método preparativo de LC-MS 3

40 Tipo de instrumento de MS: Agilent Technologies G6130B cuadrupolo; tipo de instrumento de HPLC: LC preparativa Agilent Technologies 1290; Columna: Waters XSelect™ CSH (C18, 150×19 mm, 10 µm); Flujo: 25 mL/min; Temp. de la columna: temperatura ambiente; Eluyente A: 100 % de acetonitrilo; Eluyente B: bicarbonato amónico 10 mM en agua de pH = 9,0; Gradiente:

45 $A_{t_0} = 20\%$ de A, $t_{2,5min} = 20\%$ de A, $t_{11min} = 60\%$ de A, $t_{13min} = 100\%$ de A, $t_{17min} = 100\%$ de A

$B_{t_0} = 5\%$ de A, $t_{2,5min} = 5\%$ de A, $t_{11min} = 40\%$ de A, $t_{13min} = 100\%$ de A, $t_{17min} = 100\%$ de A

50 ; Detección: DAD (210 nm); Detección: MSD (ESI pos/neg) intervalo de masa: 100 – 800; Recolección de fracciones basada en DAD.

Método preparativo de LC-MS 4

55 Tipo de instrumento de MS: Agilent Technologies G6130B cuadrupolo; tipo de instrumento de HPLC: LC preparativa Agilent Technologies 1290; Columna: Waters XBridge Protein (C4, 150×19 mm, 10 µm); Flujo: 25 mL/min; Temp. de la columna: temperatura ambiente; Eluyente A: 100 % de acetonitrilo; Eluyente B: bicarbonato amónico 10 mM en agua de pH = 9,0; Gradiente:

60 $A_{t_0} = 2\%$ de A, $t_{2,5min} = 2\%$ de A, $t_{11min} = 30\%$ de A, $t_{13min} = 100\%$ de A, $t_{17min} = 100\%$ de A

$B_{t_0} = 10\%$ de A, $t_{2,5min} = 10\%$ de A, $t_{11min} = 50\%$ de A, $t_{13min} = 100\%$ de A, $t_{17min} = 100\%$ de A

$C_{t_0} = 5\%$ de A, $t_{2,5\text{min}} = 5\%$ de A, $t_{11\text{min}} = 40\%$ de A, $t_{13\text{min}} = 100\%$ de A, $t_{17\text{min}} = 100\%$ de A

; Detección: DAD (210 nm); Detección: MSD (ESI pos/neg) intervalo de masa: 100 – 800; Recolección de fracciones basada en DAD

Método preparativo de LC-MS 1

Tipo de instrumento de MS: Agilent Technologies G6130B cuadrupolo; tipo de instrumento de HPLC: LC preparativa Agilent Technologies 1290; Columna: Waters XBridge Protein (C4, 150×19 mm, 10 μm); Flujo: 25 mL/min; Temp. de la columna: temperatura ambiente; Eluyente A: 100 % de acetonitrilo; Eluyente B: bicarbonato amónico 10 mM en agua de pH = 9,0; Gradiente:

$A_{t_0} = 2\%$ de A, $t_{2,5\text{min}} = 2\%$ de A, $t_{11\text{min}} = 30\%$ de A, $t_{13\text{min}} = 100\%$ de A, $t_{17\text{min}} = 100\%$ de A

$B_{t_0} = 10\%$ de A, $t_{2,5\text{min}} = 10\%$ de A, $t_{11\text{min}} = 50\%$ de A, $t_{13\text{min}} = 100\%$ de A, $t_{17\text{min}} = 100\%$ de A

; Detección: DAD (210 nm); Detección: MSD (ESI pos/neg) intervalo de masa: 100 – 800; Recolección de fracciones basada en DAD

Método preparativo de MP-LC 1

Tipo de instrumento: MPLC prep Reveleris™; Columna: Phenomenex LUNA C18(3) (150×25 mm, 10 μm); Flujo: 40 mL/min; Temp. de la columna: temperatura ambiente; Eluyente A: ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua, Eluyente B: ácido fórmico al 0,1% (v/v) en acetonitrilo, Gradiente:

$A_{t_{0\text{min}}} = 2\%$ de B, $t_{1\text{min}} = 2\%$ de B, $t_{2\text{min}} = 2\%$ de B, $t_{17\text{min}} = 30\%$ de B, $t_{18\text{min}} = 100\%$ de B, $t_{23\text{min}} = 100\%$ de B

$B_{t_{0\text{min}}} = 5\%$ de B, $t_{1\text{min}} = 5\%$ de B, $t_{2\text{min}} = 5\%$ de B, $t_{17\text{min}} = 40\%$ de B, $t_{18\text{min}} = 100\%$ de B, $t_{23\text{min}} = 100\%$ de B

$C_{t_{0\text{min}}} = 5\%$ de B, $t_{1\text{min}} = 5\%$ de B, $t_{2\text{min}} = 10\%$ de B, $t_{17\text{min}} = 50\%$ de B, $t_{18\text{min}} = 100\%$ de B, $t_{23\text{min}} = 100\%$ de B

; Detección UV: 210, 235, 254 nm y ELSD.

Cromatografía flash

Grace Reveleris X2® C-815 Flash; Sistema de suministro de disolventes: bomba de 3 pistones con cebado automático, 4 canales independientes con hasta 4 disolventes en una sola ejecución, cambia automáticamente de línea cuando se agota el disolvente; caudal máximo de la bomba 250 mL/min; presión máxima 50 bar (725 psi); Detección: UV 200-400 nm, combinación de hasta 4 señales de UV y barrido de todo el intervalo de UV, ELSD; tamaños de las columnas: 4-330 g en el instrumento, tipo luer, 750 g hasta 3000 g con soporte opcional.

Síntesis de SO1861-EMCH (también se hace referencia a SO1861-EMCH como SO1861-Ald-EMCH)

A SO1861 (121 mg, 0,065 mmol) y EMCH.TFA (110 mg, 0,325 mmol), se añadió metanol (extra anhidro, 3,00 mL) y TFA (0,020 mL, 0,260 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa. Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (120 mg, 90 %) como un sólido blanco esponjoso. Pureza basada en LC-MS 96 %.

LRMS (m/z): 2069 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,08⁴

SO1861-EMCH-mercaptopetanol (SO1861-EMCH (bloqueado))

A SO1861-EMCH (0,1 mg, 48 nmol), se añadieron 200 μL de mercaptopetanol (18 mg, 230 μmol) y la solución se agitó durante 1 h a 800 rpm y temperatura ambiente en un ThermoMixer C (Eppendorf). Después de agitar durante 1 h, la solución se diluyó con metanol y se dializó exhaustivamente durante 4 h frente a metanol utilizando tubos de membrana de celulosa regenerada (Spectra/Por 7) con un MWCO de 1 kDa. Después de la diálisis, se extrajo una alícuota y se analizó mediante MALDI-TOF-MS.

MALDI-TOF-MS (modo RP): m/z 2193 Da ($[M+K]^+$, SO1861-EMCH-mercaptoetanol), m/z 2185 Da ($[M+K]^+$, SO1861-EMCH-mercaptoetanol), m/z 2170 Da ($[M+Na]^+$, SO1861-EMCH-mercaptoetanol).

5 Síntesis de GalNAc trivalente-azida

Intermedio 1:

1-azido-17,17-bis((3-(*tert*-butoxi)-3-oxopropoxi)metil)-15-oxo-3,6,9,12,19-pentaoxa-16-azadocosan-22-oato de *tert*-butilo

A 3,3'-((2-amino-2-((3-(*tert*-butoxi)-3-oxopropoxi)metil)propano-1,3-diil)bis(oxi))dipropionato de di-*tert*-butilo (1,27 g, 2,51 mmol), se añadió una solución del éster N-hidroxisuccinimídico del ácido 3-azido(peg4)propiónico (977 mg, 2,51 mmol) en DMF (10 mL). A continuación, se añadió DIPEA (657 μ L, 3,77 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo (100 mL). La solución resultante se lavó con una solución de bisulfato de potasio 0,5 N (2×100 mL) y salmuera (100 mL), se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gradiente de DCM – metanol al 10 % en DCM (v/v) desde 100:0 y en aumento hasta 0:100) para obtener el compuesto del título (1,27 g, 65 %) como un aceite incoloro. Pureza basada en LC-MS 100 % (ELSD).

LRMS (m/z): 780 $[M+1]^+$

LC-MS t_R (min): 2,10²

Intermedio 2:

ácido 1-azido-17,17-bis((2-carboxietoxi)metil)-15-oxo-3,6,9,12,19-pentaoxa-16-azadocosan-22-oico

A una solución de 1-azido-17,17-bis((3-(*tert*-butoxi)-3-oxopropoxi)metil)-15-oxo-3,6,9,12,19-pentaoxa-16-azadocosan-22-oato de *tert*-butilo (1,27 g, 1,63 mmol) en DCM (5,0 mL), se añadió TFA (5,0 mL, 65 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se evaporó al vacío, se coevaporó con tolueno (3×10 mL) y DCM (3×10 mL) para obtener el producto del título crudo como un aceite incoloro.

LRMS (m/z): 611 $[M+1]^+$

Intermedio 3:

(10-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-10-(13,13-dimetil-5,11-dioxo-2,12-dioxa-6,10-diazatetradecil)-5,15-dioxo-8,12-dioxa-4,16-diazanonadecano-1,19-diil)dicarbamato de di-*tert*-butilo

Se disolvió el ácido 1-azido-17,17-bis((2-carboxietoxi)metil)-15-oxo-3,6,9,12,19-pentaoxa-16-azadocosan-22-oico (997 mg, 1,63 mmol), Oxyma Pure (1,04 g, 7,35 mmol) y EDCI.HCl (1,17 g, 6,12 mmol) en DMF (10,0 mL). A continuación, se añadió DIPEA (1,99 mL, 11,4 mmol) seguida directamente de la adición de una solución de N-BOC-1,3-propanodiamina (1,07 g, 6,12 mmol) en DMF (10,0 mL). La mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en acetato de etilo (100 mL). La solución resultante se lavó con una solución de bisulfato de potasio 0,5 N (100 mL), una solución saturada de bicarbonato de sodio (2×100 mL) y salmuera (100 mL), se secó con Na_2SO_4 , se filtró y se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante cromatografía flash (gradiente de DCM – metanol al 10 % en DCM (v/v) 0:100 y en aumento hasta 100:0, manteniéndose a 100:0 hasta que se eluyó el producto) para obtener el compuesto del título (1,16 g, 66 %) como un aceite viscoso amarillento. LC-MS 99 % (ELSD).

LRMS (m/z): 1080 $[M+1]^+$

LC-MS t_R (min): 1,51³

Intermedio 4:

síntesis de tris(2,2,2-trifluoroacetato) de 3,3'-((2-((3-((3-aminopropil)amino)-3-oxopropoxi)metil)-2-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)propano-1,3-diil)bis(oxi))bis(N-(3-aminopropil)propanamida)

A una solución de (10-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-10-(13,13-dimetil-5,11-dioxo-2,12-dioxa-6,10-diazatetradecil)-5,15-dioxo-8,12-dioxa-4,16-diazanonadecano-1,19-diil)dicarbamato de di-*tert*-butilo (1,16 g, 1,08 mmol) en DCM (10 mL), se añadió TFA (10 mL, 131 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se evaporó al vacío, se coevaporó con tolueno (3 × 10 mL) y DCM (3 × 10 mL) para obtener el producto del título crudo como un aceite viscoso amarillento.

LRMS (m/z): 260 [M+3]³⁺, 390 [M+2]²⁺, 780 [M+1]¹⁺,

Intermedio 5:

diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-((5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentil)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo

Se disolvió el ácido 5-(((2R,3R,4R,5R,6R)-3-acetamido-4,5-diacetoxi-6-(acetoximetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)oxi)pentanoico (obtenido de acuerdo con *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 16958-16961, 3,00 g, 6,70 mmol) y *N*-hidroxisuccinimida (926 mg, 8,05 mmol) en DCM (50 mL). A continuación, se añadió EDCI.HCl (1,54 g, 8,05 mmol) y 4-(dimetilamino)piridina (82 mg, 0,67 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó con DCM y la solución resultante se lavó con una solución de bisulfato de potasio 0,5 N (150 mL), una solución saturada de bicarbonato de sodio (150 mL) y salmuera (150 mL), se secó con Na₂SO₄, se filtró y se evaporó al vacío para obtener el compuesto del título (3,60 g, 99 %) como una espuma blanca. Pureza basada en LC-MS 99 % (ELSD).

LRMS (m/z): 545 [M+1]¹⁺

LC-MS t_R (min): 1,07³

Intermedio 6:

acetato de [(3R,6R)-3,4-bis(acetiloxi)-6-{4-[(3-{3-[2-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-3-(2-{[3-(5-((2R,5R)-4,5-bis(acetiloxi)-6-[(acetiloxi)metil]-3-acetamidooxan-2-il]oxi)pentanamido)propil]carbamoil]etoxi)-2-[(2-{[3-(5-((2R,5R)-4,5-bis(acetiloxi)-6-[(acetiloxi)metil]-3-acetamidooxan-2-il]oxi)pentanamido)propil]carbamoil]etoxi)metil]propoxi]propanamido}propil]carbamoil]butoxi)-5-acetamidooxan-2-il]metilo

Se disolvió tris(2,2,2-trifluoroacetato) de 3,3'-(2-((3-((3-aminopropil)amino)-3-oxopropoxi)metil)-2-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)propano-1,3-diil)bis(oxi))bis(N-(3-aminopropil)propanamida) (1,21 g, 1,08 mmol) en una mezcla de DMF (10 mL) y DIPEA (1,69 mL, 9,70 mmol). A continuación, se añadió diacetato de (2R,3R,4R,5R,6R)-5-acetamido-2-(acetoximetil)-6-((5-((2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi)-5-oxopentil)oxi)tetrahidro-2H-piran-3,4-diilo (2,20 g, 4,04 mmol) y la mezcla de reacción se agitó durante el fin de semana a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía flash (gradiente de DCM – metanol al 30 % en DCM (v/v) desde 0:100 y en aumento hasta 100:0) para obtener el compuesto del título (1,84 g, 83 %) como una espuma de color amarillento. LC-MS 95 % (ELSD).

LRMS (m/z): 2068 [M+1]¹⁺

LC-MS t_R (min): 1,18³

Intermedio 7:

GalNAc trivalente-azida

Se disolvió acetato de [(3R,6R)-3,4-bis(acetiloxi)-6-{4-[(3-{3-[2-(1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amido)-3-(2-{[3-(5-((2R,5R)-4,5-bis(acetiloxi)-6-[(acetiloxi)metil]-3-acetamidooxan-2-il]oxi)pentanamido)propil]carbamoil]etoxi)-2-[(2-{[3-(5-((2R,5R)-4,5-bis(acetiloxi)-6-[(acetiloxi)metil]-3-acetamidooxan-2-il]oxi)pentanamido)propil]carbamoil]etoxi)metil]propoxi]propanamido}propil]carbamoil]butoxi)-5-acetamidooxan-2-il]metilo (300 mg, 0,145 mmol) en una mezcla de trietilamina (2,00 mL, 14,4 mmol), metanol (2,00 mL) y agua (2,00 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se evaporó al vacío. El residuo se purificó mediante MP-LC preparativa.^{2B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (164 mg, 67%) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 97 %.

LRMS (m/z): 1688 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,99^{1A}

Síntesis de GalNAc trivalente-SO1861 y GalNAc-SO1861 (Figura 2, 4)

Intermedio 8:

SO1861-NH₂

Se disolvió SO1861-azida (6,89 mg, 3,20 μ mol) en una mezcla de carbonato de potasio 32 mM (150 μ L, 4,80 μ mol) y acetonitrilo (150 μ L). Inmediatamente después, se añadió una solución de trimetilfosfina 1,0 M en THF (32 μ L, 32 μ mol) y la mezcla resultante se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa. Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (5,30 mg, 78 %) como un sólido blanco esponjoso. Pureza basada en LC-MS 94 %.

LRMS (m/z): 1062 [M-2]²⁻

LC-MS t_R (min): 2,51^{1B}

Intermedio 9:

SO1861-DBCO

A SO1861-amina (48,6 mg, 22,9 μ mol) y DBCO-NHS (13,0 mg, 32,4 μ mol), se añadió una solución de DIPEA (5,98 μ L, 34,3 μ mol) y DMF (2,0 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 4 horas, la mezcla de reacción se diluyó con una solución de bicarbonato de sodio 50 mM (1,00 mL, 50 μ mol). La mezcla resultante se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{1B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (16,9 mg, 31 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 94 %.

LRMS (m/z): 2412 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 2,45^{1B}

Síntesis de SO1861-L-GalNAc trivalente

Se disolvió SO1861-DBCO (7,50 mg, 3,11 μ mol) y GalNAc trivalente-azida (5,31 mg, 3,14 μ mol) en una mezcla de agua/acetonitrilo (2:1, v/v, 0,90 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{3B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (9,60 mg, 75 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 99 %.

LRMS (m/z): 2050 [M-2]²⁻

LC-MS t_R (min): 2,04^{1B}

Síntesis de SO1861-L-GalNAc

Se disolvió SO1861-DBCO (1,75 mg, 0,73 μ mol) y GalNAc-PEG3-azida (0,82 mg, 2,18 μ mol) en una mezcla de agua/acetonitrilo (1:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{3B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (1,63 mg, 81 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 100 %.

LRMS (m/z): 2790 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 2,15^{1B}

Síntesis de GalNAc trivalente-oligo BNA (Figura 6, 7)Intermedio 10:

5 **4-{2-azatriciclo[10,4,0,0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-N-[2-(2-{2-([4-(E)-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido]imino}metil]fenil}formamido)etoxi]etoxi]etil]-4-oxobutanamida**

Se disolvió 4-{2-azatriciclo[10,4,0,0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-N-[2-(2-{2-([4-formilfenil]formamido)etoxi]etoxi]etil]-4-oxobutanamida (25,0 mg, 40,9 μ mol) y EMCH.TFA (20,8 mg, 61,3 μ mol) en metanol (extra anhidro, 2,00 mL). A continuación, se añadió TFA (9,39 μ L, 123 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{1B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (16,2 mg, 48 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 91 %.

LRMS (m/z): 410,2 [M+2]²⁺

LC-MS t_R (min): 1,41²

Intermedio 11:**GalNAc trivalente-L-maleimida**

25 Se disolvió GalNAc trivalente-azida (20,3 mg, 12,0 μ mol) y 4-{2-azatriciclo[10,4,0,0^{4,9}]hexadeca-1(12),4(9),5,7,13,15-hexaen-10-in-2-il}-N-[2-(2-{2-([4-(E)-{[6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanamido]imino}metil]fenil}formamido)etoxi]etoxi]etil]-4-oxobutanamida (11,8 mg, 14,4 μ mol) en una mezcla de agua/acetonitrilo (2:1, v/v, 0,90 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{2C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (25,6 mg, 85 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 88 %.

LRMS (m/z): 2101 [M-405]¹⁻, 2304 [M-202]¹⁻, 2507 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,90^{1B} (picos dobles debidos a los isómeros)

Intermedio 12:**GalNAc trivalente-S-maleimida**

40 Se disolvió GalNAc trivalente-azida (20,3 mg, 12,0 μ mol) y DBCO-maleimida (10,3 mg, 24,0 μ mol) en una mezcla de agua/acetonitrilo (2:1, v/v, 0,90 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{2D} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (22,2 mg, 87 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 85 %. Contiene un 10 % de la maleimida hidrolizada.

LRMS (m/z): 2115 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,60^{1B} (picos dobles debidos a los isómeros)

Síntesis de GalNAc trivalente-S-oligo BNA de ApoB (o HSP27)

55 A disulfuro de oligo BNA de ApoB (5,00 mg, 0,686 μ mol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (1,00 mL, 2,5 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 $\times$ g durante 30 min, 2 $\times$ 0,50 mL). A continuación, la solución residual se lavó dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (0,50 mL), filtrando cada vez en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL) y la solución resultante se añadió directamente a GalNAc trivalente-S-maleimida (3,02 mg, 1,43 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar

a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (6,75 mg, cuant.) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 94 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2318 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 1,65^{1A}

Síntesis de GalNAc trivalente-S-oligo BNA aleatorizado de ApoB (o HSP27)

A disulfuro de oligo BNA aleatorizado de ApoB (5,00 mg, 0,688 µmol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (1,00 mL, 2,5 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 × g durante 30 min, 2 × 0,50 mL). A continuación, la solución residual se lavó dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (0,50 mL), filtrando cada vez en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL) y la solución resultante se añadió directamente a GalNAc trivalente-S-maleimida (3,09 mg, 1,46 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (5,91 mg, 93 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 88 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2311 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 1,60^{1A}

Síntesis de GalNAc trivalente-L-oligo BNA de ApoB (o HSP27)

A disulfuro de oligo BNA de ApoB (5,00 mg, 0,686 µmol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (1,00 mL, 2,5 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 × g durante 30 min, 2 × 0,50 mL). A continuación, la solución residual se lavó dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (0,50 mL), filtrando cada vez en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL) y la solución resultante se añadió directamente a GalNAc trivalente-L-maleimida (3,63 mg, 1,45 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (6,68 mg, cuant.) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 99 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2416 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 1,97^{1A}

Síntesis de GalNAc trivalente-L-oligo BNA aleatorizado de ApoB (o HSP27)

A disulfuro de oligo BNA aleatorizado de ApoB (5,00 mg, 0,688 µmol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (1,00 mL, 2,5 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 × g durante 30 min, 2 × 0,50 mL). A continuación, la solución residual se lavó dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (0,50 mL), filtrando cada vez en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL) y la solución resultante se añadió directamente a GalNAc trivalente-L-maleimida (3,68 mg, 1,47 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (4,71 mg, 71 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 96 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2409 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 1,93^{1A}

Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente y dendrón(-L-SO1861)₈-GalNAc trivalente

Intermedio 13:

GalNAc trivalente-formiato de amina

Se disolvió GalNAc trivalente-azida (36,5 mg, 21,6 μmol) en una solución de carbonato de potasio (5,97 mg, 43,2 μmol) en agua (1,00 mL) y en acetonitrilo (1,00 mL). A continuación, se añadió una solución de trimetilfosfina 1,0 M en THF (216 μL, 216 μmol) y la mezcla resultante se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 45 min, la mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en agua/acetonitrilo (9:1, v/v, 1 mL). La solución resultante se sometió directamente a MP-LC preparativa.^{2B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (36,1 mg, 98 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 100 %.

LRMS (m/z): 1662 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,62^{1A}

Intermedio 14:

GalNAc trivalente-DBCO

Se disolvió GalNAc trivalente-formiato de amina (17,4 mg, 10,2 μmol) DBCO-NHS (6,14 mg, 15,3 μmol) en una solución de NMM (2,24 μL, 20,3 μmol) en DMF (0,50 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en agua/acetonitrilo (8:2, v/v, 1 mL). La solución resultante se sometió directamente a MP-LC preparativa.^{2C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (14,2 mg, 72 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 96 %.

LRMS (m/z): 1950 [M-1]¹

LC-MS t_R (min): 1,86^{1B}

Intermedio 15:

dendrón(-L-SO1861)₈-azida

Se disolvió dendrón(-L-SO1861)₈-amina (19,6 mg, 1,08 μmol) y 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de 2,5-dioxipirrolidin-1-ilo (4,17 mg, 10,8 μmol) en DMF (1,50 mL). A continuación, se añadió DIPEA (1,87 μL, 10,8 μmol) y la mezcla se agitó durante 1 min y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (11,7 mg, 59 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 92 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2316 [M-8]⁸⁻, ; 2647 [M-7]⁷⁻

LC-MS t_R (min): 4,29^{1A}

Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente

Se disolvió dendrón(-L-SO1861)₄-azida (2,50 mg, 0,266 μmol) y GalNAc trivalente-DBCO (1,56 mg, 0,799 μmol) en una mezcla de agua/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (2,74 mg, 91 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 86 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2832 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 4,07^{1A}

Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₈-GalNAc trivalente

Se disolvió dendrón(-L-SO1861)₈-azida (2,50 mg, 0,135 μmol) y GalNAc trivalente-DBCO (0,79 mg, 0,405 μmol) en una mezcla de agua/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (2,03 mg, 74 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 100 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2559 [M-8]⁸⁻, 2925 [M-7]⁷⁻

LC-MS t_R (min): 4,18^{1A}

Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-L-oligo BNA-GalNAc trivalente y dendrón(-L-SO1861)₈-L-oligo BNA-GalNAc trivalente

Intermedio 16:

GalNAc trivalente-tioacetato

Se disolvió GalNAc trivalente-formiato de amina (18,7 mg, 11,0 μmol) y 3-(acetiltio)propanoato de 4-nitrofenilo (5,90 mg, 21,9 μmol) en una solución de NMM (2,41 μL, 21,9 μmol) en DMF (0,50 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en una mezcla de ácido fórmico al 0,1 % en agua y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo (9:1, v/v, 1 mL). La solución resultante se sometió directamente a MP-LC preparativa.^{2B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (13,0 mg, 66 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 100 %.

LRMS (m/z): 1749 [M-43]¹⁻, 1792 [M-1]¹

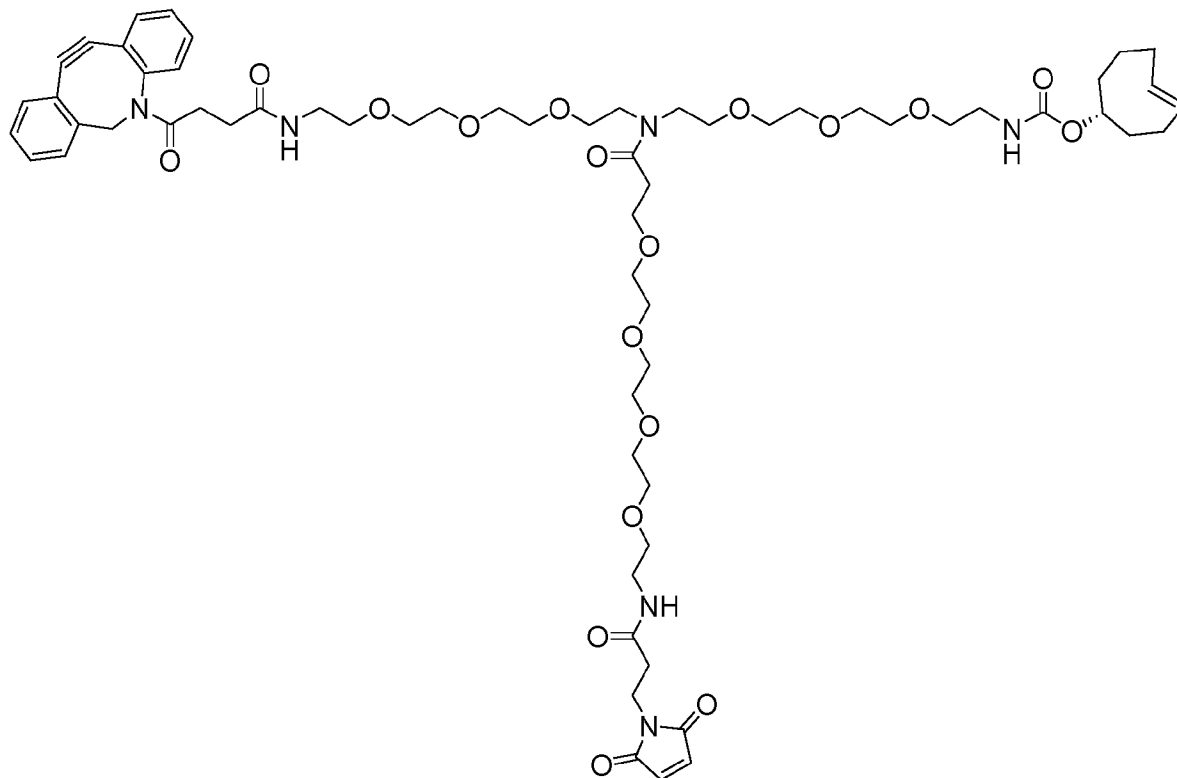
LC-MS t_R (min): 1,24^{1B}

Intermedio 17:

DBCO-TCO-GalNAc trivalente

Se disolvió GalNAc trivalente-tioacetato (13,0 mg, 7,25 μmol) en metanol (0,50 mL). A continuación, se añadió una solución de hidróxido de sodio 1 M (7,98 μL, 7,98 μmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se añadió a una solución recién preparada de un conector trifuncional (Ls-t) (es decir, es un ejemplo de un conector del resto de saponina Ls) (7,39 mg, 6,13 μmol) en bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 2,00 mL).

El conector trifuncional tiene el nombre de la IUPAC: éster (1*R*,4*E*)-4-cicloocten-1-ílico del ácido 5,8,11,18,21,24,27-hepta-2,14,30-triazatritriacontanoico, 14-[16-(11,12-didehidrodibenz[*b,f*]azocin-5(6*H*)-il)-13,16-dioxo-3,6,9-trioxa-12-azahexadec-1-il]-33-(2,5-dihidro-2,5-dioxo-1*H*-pirrol-1-il)-15,31-dioxo-. El conector trifuncional tiene la siguiente fórmula (XXI):



(XXI)

La mezcla resultante se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{2A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (3,83 mg, 21 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 89 %.

LRMS (m/z): 2409 [M-546]¹⁻, 2955 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 2,66^{1B}

Intermedio 18:

Metiltetrazina-L-oligo BNA de ApoB

A disulfuro de oligo BNA de ApoB (5,00 mg, 0,686 μmol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (1,00 mL, 2,5 μmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 × g durante 30 min, 2 × 0,50 mL). A continuación, la solución residual se lavó dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (0,50 mL), filtrando cada vez en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM (1,50 mL) y la mezcla resultante se añadió directamente a una solución de (E)-1-(4-((2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)hidrazinoiliden)metil)benzamido)-N-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)encil)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (1,36 mg, 1,73 μmol) en acetonitrilo (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se congeló y se liofilizó durante la noche para proporcionar el producto del título crudo como un sólido esponjoso de

color rosa. Al producto crudo se le añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM (1,50 mL) y la suspensión resultante se filtró sobre un filtro de jeringa de 0,45 µm. El filtrado se liofilizó durante la noche para proporcionar el producto del título (5,44 mg, cuant.) como un sólido esponjoso de color rosa. Pureza basada en LC-MS 90 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2648 [M-3]³⁻

LC-MS t_R (min): 0,62⁴

Intermedio 19:

Metiltetrazina-L-oligo BNA aleatorizado de ApoB

A disulfuro de oligo BNA aleatorizado de ApoB (5,00 mg, 0,688 µmol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (1,00 mL, 2,5 µmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 × g durante 30 min, 2 × 0,50 mL). A continuación, la solución residual se lavó dos veces con una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 2,5 mM (0,50 mL), filtrando cada vez en las mismas condiciones descritas anteriormente. A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM (1,50 mL) y la mezcla resultante se añadió directamente a una solución de (E)-1-(4-((2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)hidrazinoiliden)metil)benzamido)-N-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)bencil)-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (1,34 mg, 1,70 µmol) en acetonitrilo (0,5 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se congeló y se liofilizó durante la noche para proporcionar el producto del título crudo como un sólido esponjoso de color rosa. Al producto crudo se le añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM (1,50 mL) y la suspensión resultante se filtró sobre un filtro de jeringa de 0,45 µm. El filtrado se liofilizó durante la noche para proporcionar el producto del título (5,48 mg, cuant.) como un sólido esponjoso de color rosa. Pureza basada en LC-MS 84 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2639 [M-3]³⁻

LC-MS t_R (min): 0,58⁴

Intermedio 20:

DBCO-L-oligo BNA de ApoB-GalNAc trivalente

A metiltetrazina-L-oligo BNA de ApoB (5,44 mg, 0,684 µmol) y DBCO-TCO-GalNAc trivalente (2,03 mg, 0,687 µmol), se añadió bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (2,87 mg, 39 %) como un sólido esponjoso blanco. LC-MS muestra múltiples picos anchos con los valores correctos de m/z.

LRMS (m/z): 2175 [M-5]⁵⁻, 2718 [M-6]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 2,60-3,00^{1A}

Intermedio 21:

DBCO-L-oligo BNA aleatorizado de ApoB-GalNAc trivalente

A metiltetrazina-L-oligo BNA aleatorizado de ApoB (5,48 mg, 0,692 µmol) y DBCO-TCO-GalNAc trivalente (1,80 mg, 0,609 µmol), se añadió bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (2,15 mg, 33 %) como un sólido esponjoso blanco. LC-MS muestra múltiples picos anchos con los valores correctos de m/z.

LRMS (m/z): 2169 [M-5]⁵⁻, 2711 [M-6]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 2,58-3,20^{1A}

Síntesis de conector trivalente-L-SPT001-(TCO bloqueado)-GalNAc trivalente

5 Intermedio 22 (Figura 25)

GalNAc trivalente-tiol

10 Se disolvió GalNAc trivalente-tioacetato (16,2 mg, 9,02 μ mol) en metanol (500 μ L). A continuación, se añadió una solución de hidróxido de sodio 1,00 M (11,0 μ L, 11,0 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{1A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (13,1 mg, 83 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 98 %.

15 LRMS (m/z): 1748 [M-H]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,78^{1A}

20 Intermedio 23: (Figura 25)

DBCO-TCO-GalNAc trivalente

25 Se disolvió el conector trifuncional (15,0 mg, 12,4 μ mol) en acetonitrilo (0,50 mL). A continuación, se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM (1,50 mL) y la solución resultante se transfirió directamente a GalNAc trivalente-tiol (22,7 mg, 13,0 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se congeló y se liofilizó durante la noche para proporcionar el producto del título crudo como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 84 %.

30 LRMS (m/z): 2409 [M-546]¹⁻, 2955 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 2,63^{1B}

Intermedio 24 (Figura 26):

35 *N*-(2-hidroxietil)-2-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)acetamida

40 A una solución de metiltetrazina-éster de NHS (30,0 mg, 91,7 μ mol) en DMF (1,00 mL), se añadió etanolamina (11,1 μ L, 0,184 mmol) y trietilamina (25,5 μ L, 0,183 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{1B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (19,2 mg, 77 %) como un sólido de color lila. Pureza basada en LC-MS 89 %.

45 LRMS (m/z): 274 [M+1]¹⁺

LC-MS t_R (min): 0,85²

Conector trivalente-L-SPT001-(TCO bloqueado)-GalNAc trivalente

50 Se añadió una solución de DBCO-TCO-GalNAc trivalente (36,8 mg, 12,5 μ mol) en DMF (2,0 mL) a SO1861-L-azida (26,8 mg, 12,5 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, se añadió *N*-(2-hidroxietil)-2-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)fenil)acetamida (4,08 mg, 14,9 μ mol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 30 min, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{1C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (37,3 mg, 56 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 96 % (picos dobles debidos a los regioisómeros).

55 LRMS (m/z): 2676 [M-2]²⁻

60 LC-MS t_R (min): 2,23^{1B}

Síntesis de conector trivalente-(DBCO bloqueado)-oligo BNA-GalNAc trivalenteIntermedio 25 (Figura 27):**metiltetrazina-oligo BNA**

A Tio1-13-disulfuro de oligo BNA de ApoB (20 mg, 4,17 μmol), se añadió una solución de bicarbonato de amonio 20 mM con TCEP 5,0 mM (2,00 mL, 10,0 μmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se filtró utilizando un filtro de centrifuga con un punto de corte del peso molecular de 3000 Da (5000 $\times$ g durante 30 min, 4 $\times$ 0,50 mL). A continuación, la solución residual se diluyó con bicarbonato de amonio 20 mM (3,00 mL) y la mezcla resultante se añadió directamente a una solución de (E)-1-(4-((2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)hidrazinoiliden)metil)benzamido)-N-(4-(6-metil-1,2,4,5-tetrazin-3-il)bencil)-6,9,12-tetraoxapentadecan-15-amida (7,22 mg, 9,16 μmol) en acetonitrilo (1,0 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 1 hora, la mezcla de reacción se congeló y se liofilizó durante la noche para proporcionar el producto del título crudo como un sólido esponjoso de color rosa. Al producto crudo se le añadió bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (2:1, v/v, 2,00 mL) y la solución resultante se sometió a LC-MS preparativa.^{1A} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (20,3 mg, 89 %) como un sólido esponjoso de color rosa. Pureza basada en LC-MS 93 % (pico ancho).

LRMS (m/z): 1817 [M-3]³⁻LC-MS t_R (min): 0,59³Intermedio 26 (Figura 27):**(DBCO bloqueado) -TCO-GalNAc trivalente**

Se añadió una solución de 1-azido-3,6,9-trioxaundecan-11-ol (2,17 mg, 9,88 μmol) en DMF (0,50 mL) a DBCO-TCO-GalNAc trivalente (14,6 mg, 4,94 μmol). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a MP-LC preparativa.^{1C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (10,00 mg, 64 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 98 %.

LRMS (m/z): 1750 [fragmento]

LC-MS t_R (min): 2,33^{1B}**Conector trivalente-(DBCO bloqueado)-oligo BNA-GalNAc trivalente**

Se disolvió (DBCO bloqueado)-TCO-GalNAc trivalente (10,0 mg, 3,15 μmol) y metiltetrazina-oligo BNA (10,0 mg, 1,83 μmol) en una solución de bicarbonato de amonio 20 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 3 horas, la mezcla de reacción se congeló y se liofilizó durante la noche. El producto crudo se disolvió en bicarbonato de amonio 20 mM (1 mL) y la solución resultante se sometió directamente a LC-MS preparativa.^{1B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (11,3 mg, 72 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 95 % (múltiples picos (anchos) debidos a los regioisómeros).

LRMS (m/z): 2149 [M-4]⁴⁻, 2866 [M-3]³⁻LC-MS t_R (min): 2,92^{1A}**dendrón(-L-SO1861)₄-amina (molécula 15)**

Se disolvió formiato de N,N'-((9S,19S)-14-(6-aminohexanoil)-1-mercapto-9-(3-mercaptopropanamido)-3,10,18-trioxo-4,11,14,17-tetraazatricosan-19,23-diil)bis(3-mercaptopropanamida) (2,73 mg, 3,13 μmol) en una mezcla de NH_4HCO_3 20 mM con TCEP 0,5 mM/acetonitrilo (3:1, v/v, 3,00 mL). A continuación, se añadió SO1861-EMCH (29,2 mg, 0,014 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 1,5 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{3B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se

congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (12,3 mg, 43 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 97 %.

LRMS (m/z): 1517 [M-6]⁶⁻, 1821 [M-5]⁵⁻, 2276 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 4,39^{5A}

Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente (Figura 33A-C) y dendrón(-L-SO1861)₈-GalNAc trivalente

10 Dendrón(-L-SO1861)₄-azida (molécula 19)

Se sintetiza dendrón(-L-SO1861)₄-azida basándose en dendrón(SPT001)₄-NH₂ (molécula 15, Figura 33B) donde este dendrón-amina se trató con azido-PEG₄-éster de NHS (molécula 18) en DMF con DIPEA como base.

15 GalNAc trivalente-formiato de amina (molécula 22 en la Figura 33C)

Se disolvió GalNAc trivalente-azida (36,5 mg, 21,6 μmol; molécula 21 en la Figura 33C) en una solución de carbonato de potasio (5,97 mg, 43,2 μmol) en agua (1,00 mL) y en acetonitrilo (1,00 mL). A continuación, se añadió una solución de trimetilfosfina 1,0 M en THF (216 μL, 216 μmol) y la mezcla resultante se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 45 min, la mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en agua/acetonitrilo (9:1, v/v, 1 mL). La solución resultante se sometió directamente a MP-LC preparativa.^{2B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (36,1 mg, 98 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 100 %.

LRMS (m/z): 1662 [M-1]¹⁻

LC-MS t_R (min): 1,62^{1A}

30 GalNAc trivalente-DBCO (molécula 23 en la Figura 33C)

Se disolvió GalNAc trivalente-formiato de amina (17,4 mg, 10,2 μmol; molécula 22) y DBCO-NHS (6,14 mg, 15,3 μmol; molécula 10 en la Figura 33C) en una solución de NMM (2,24 μL, 20,3 μmol) en DMF (0,50 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se evaporó al vacío y el residuo se disolvió en agua/acetonitrilo (8:2, v/v, 1 mL). La solución resultante se sometió directamente a MP-LC preparativa.^{2C} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (14,2 mg, 72 %) como un sólido blanco. Pureza basada en LC-MS 96 %.

LRMS (m/z): 1950 [M-1]¹

LC-MS t_R (min): 1,86^{1B}

dendrón(-L-SO1861)₈-azida

Se disolvió dendrón(-L-SO1861)₈-amina (19,6 mg, 1,08 μmol) y 1-azido-3,6,9,12-tetraoxapentadecan-15-oato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (4,17 mg, 10,8 μmol) en DMF (1,50 mL). A continuación, se añadió DIPEA (1,87 μL, 10,8 μmol) y la mezcla se agitó durante 1 min y se dejó reposar durante la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (11,7 mg, 59 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 92 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2316 [M-8]⁸⁻, 2647 [M-7]⁷⁻

LC-MS t_R (min): 4,29^{1A}

55 Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₄-GalNAc trivalente (molécula 24 en la Figura 33C)

Se disolvió dendrón(-L-SO1861)₄-azida (2,50 mg, 0,266 μmol; síntesis representada en la Figura 33A-C, molécula 19 en la Figura 33C) y GalNAc trivalente-DBCO (1,56 mg, 0,799 μmol; molécula 23 en la Figura 33C) en una mezcla de agua/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4B} Las fracciones

correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (2,74 mg, 91 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 86 % (pico muy ancho).

5 LRMS (m/z): 2832 [M-4]⁴⁻

LC-MS t_R (min): 4,07^{1A}

10 Síntesis de dendrón(-L-SO1861)₈-GalNAc trivalente

Se disolvió dendrón(-L-SO1861)₈-azida (2,50 mg, 0,135 μmol) y GalNAc trivalente-DBCO (0,79 mg, 0,405 μmol; molécula 23 en la Figura 33C) en una mezcla de agua/acetonitrilo (3:1, v/v, 1,00 mL). La mezcla de reacción se agitó durante 1 min y se dejó reposar a temperatura ambiente. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se sometió a LC-MS preparativa.^{4B} Las fracciones correspondientes al producto se agruparon inmediatamente, se congelaron y se liofilizaron durante la noche para obtener el compuesto del título (2,03 mg, 74 %) como un sólido esponjoso blanco. Pureza basada en LC-MS 100 % (pico muy ancho).

LRMS (m/z): 2559 [M-8]⁸⁻, 2925 [M-7]⁷⁻

20 LC-MS t_R (min): 4,18^{1A}

Síntesis de anti-CD71-saporina

Se produjo un conjugado de mab contra CD71-saporina personalizado y se adquirió de Advanced Targeting Systems (San Diego, CA). El anticuerpo monoclonal contra CD71 se adquirió de InVivoMab, anti-CD71 humano (OKT-9), BioXCell.

Secuencias de oligo de BNA HSP27, ApoB y ApoB_{aleatorizado}, y ApoB#02

30 HSP27 (5'-GGCacagccagtGCG-3') [SEQ ID NO: 1] (el BNA antisentido (HSP27) fue BNA, más específicamente BNA^{NC}, con la secuencia de oligo de ácido nucleico 5'-GGCacagccagtGCG-3' de acuerdo con Zhang *et al.* (2011) [Y Zhang, Z Qu, S Kim, V Shi, B Liao1, P Kraft, R Bandaru, Y Wu, LM Greenberger y ID Horak, *Down-modulation of cancer targets using locked nucleic acid (LNA)-based antisense oligonucleotides without transfection, Gene Therapy* (2011) 18, 326–333]), ApoB (5'-GCCTCagtctgcttcGCACC-3') [SEQ ID NO: 2] y ApoB_{aleatorizado} (5'-GGCCTctctacacgCTCGT-3') [SEQ ID NO: 3], y ApoB#02 compatible con la secuencia humana y de murino (5'-GCattggtatTCA-3') [SEQ ID NO: 12]. Los oligos de BNA^{NC} se encargaron con un conector de 5'-tiol C6 en Bio-Synthesis Inc, con las bases de BNA en mayúsculas y las cadenas principales totalmente sustituidas con fosforotioato (Lewisville, Texas).

40 Aislamiento de ARN y análisis de la expresión génica a partir de un cultivo de células humanas

Se aisló el ARN de las células y se analizó de acuerdo con los protocolos estándar (Biorad). Los cebadores de qPCR que se utilizaron se indican en la Tabla A2.

45 **Tabla A2.** Los cebadores utilizados en qPCR se muestran a continuación:

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')
HSP27	Directo	GCAGTCCAACGAGATCACCA [SEQ ID NO: 4]
	Inverso	TAAGGCTTTACTTGCGGCA [SEQ ID NO: 5]
ApoB	Directo	AGGGTCCGGAATCTGATGA [SEQ ID NO: 6]
	Inverso	TGGGCACGTTGTCTTTCAGAG [SEQ ID NO: 7]
HBMS	Directo	CACCCACACAGCCTACTT [SEQ ID NO: 8]
	Inverso	GTACCCACGCGAATCACTCT [SEQ ID NO: 9]
GUSB	Directo	GAAAATACGTGTTGGAGAGCT [SEQ ID NO: 10]
	Inverso	CCGAGTGAAGATCCCCTTTT [SEQ ID NO: 11]

Ensayo de viabilidad celular (MTS)

Después del tratamiento, las células se incubaron durante 72 h a 37 °C antes de determinar la viabilidad celular mediante un ensayo de MTS, realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ensayo de proliferación celular CellTiter 96® AQueous One Solution, Promega). En resumen, la solución de MTS se diluyó 20' en DMEM sin rojo de fenol (PAN-Biotech GmbH) complementado con un 10 % de FBS. Las células se lavaron una vez con 200 µL de PBS/pocillo, después de lo cual se añadieron 100 µL de solución diluida de MTS/pocillo. La placa se incubó durante aproximadamente 20-30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se midió la DO a 492 nm en un lector de placas Thermo Scientific Multiskan FC (Thermo Scientific). Para la cuantificación, la señal de fondo de los pocillos con "solo medio" se sustrajo de todos los demás pocillos, antes de calcular el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas/no tratadas, dividiendo la señal de fondo corregida de los pocillos tratados entre la señal de fondo corregida de los pocillos no tratados (x 100).

Ensayo de viabilidad celular (CTG)

Después del tratamiento, las células se incubaron durante 72 h a 37 °C antes de determinar la viabilidad celular mediante un ensayo de CTG, realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante (ensayo de viabilidad celular CellTiter-Glo® 2.0, Promega). En resumen, en primer lugar, la placa de células se equilibró a TA durante 30 minutos. A continuación, a cada pocillo que contenía 120 µL de medio de tratamiento, se añadieron 120 µL de solución de CTG. La placa se mezcló brevemente (10 s, 600 rpm) y se incubó durante aproximadamente 10 minutos en la oscuridad a TA. Posteriormente, se midió la señal de luminiscencia en un lector de placas Spectramax ID5 (Molecular Devices). Para la cuantificación, la señal de fondo de los pocillos con "solo medio" se sustrajo de todos los demás pocillos, antes de calcular el porcentaje de viabilidad celular de las células tratadas/no tratadas, dividiendo la señal de fondo corregida de los pocillos tratados entre la señal de fondo corregida de los pocillos no tratados (x 100).

Análisis de FACS

Las células se sembraron en DMEM (PAN-Biotech GmbH) complementado con un 10 % de suero bovino fetal (PAN-Biotech GmbH) y un 1 % de penicilina/estreptomicina (PAN-Biotech GmbH), en matraces T75 con la densidad adecuada para cada línea celular y se incubaron durante 72-96 h (5 % de CO₂, 37 °C), hasta alcanzar una confluencia de un 90 %. A continuación, las células se tripsinizaron (TrypLE Express, Gibco Thermo Scientific) en células individuales, se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron (1400 rpm, 3 min). Se descartó el sobrenadante mientras se dejaba sumergido el sedimento celular. Se transfirieron 500 000 células a tubos FACS de fondo redondo y se lavaron con 3 mL de DPBS fría (exenta de Mg²⁺ y Ca²⁺, 2 % de FBS). Las células se centrifugaron a 1800 rpm durante 3 min a 4 °C y se suspendieron de nuevo en 200 µL de DPBS fría (exenta de Mg²⁺ y Ca²⁺, 2 % de FBS) o 200 µL de solución de anticuerpo, que contenía 5 µL de anticuerpo en 195 µL de DPBS fría (exenta de Mg²⁺ y Ca²⁺, 2 % de FBS). Se utilizó PE anti-CD71 humano (#334106, Biolegend) para teñir el receptor de transferrina, se utilizó PE IgG2a de ratón, FC de control de isotipo κ (#400212, Biolegend), como su control de isotipo coincidente. Se utilizó PE anti-ASGPR1 humano (#130-122-963, Miltenyi) para teñir el receptor ASGPR1 y se utilizó PE IgG1 de ratón, control de isotipo (#130-113-762, Miltenyi), como su control de isotipo coincidente. Las muestras se incubaron durante 30 min a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron 2x con DPBS fría (exenta de Mg²⁺ y Ca²⁺, 2 % de FBS) y se fijaron durante 20 min a temperatura ambiente utilizando una solución de PFA al 2 % en DPBS (exenta de Mg²⁺ y Ca²⁺, 2 % de FBS). Las células se lavaron 1 x con DPBS fría y se suspendieron de nuevo en 1000 µL de DPBS fría para el análisis de FACS. Las muestras se analizaron con un sistema de citometría de flujo Sysmex Cube 8 (Sysmex) y el software FCS Express 7 Research edition. Los resultados de los análisis de FACS se resumen en la Tabla A3.

Tabla A3. Niveles de expresión del receptor de la membrana celular para ASPGR1 y CD71 de células HepG2 y Huh7

Línea celular	Nivel de expresión de ASPGR1 (MFI)	Nivel de expresión de CD71 (MFI)
HepG2	8,8	74,7
Huh7	1,6	109

Tratamiento de hepatocitos primarios de ratón

Se descongelaron hepatocitos primarios de ratón conservados criológicamente (PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Alemania) en medio de descongelación de hepatocitos (HTM, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Alemania) y se lavaron 1 x con medio de lavado de hepatocitos (HWM, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Alemania). Las células se suspendieron de nuevo en medio para la siembra en placas de hepatocitos (HPM Cryo, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Alemania) con una densidad de aprox. 0,275 x 10⁶ células/mL. Las células se sembraron en placas recubiertas con colágeno-I con una densidad de 88 000 células/pocillo o 26 400 células/pocillo para las placas de 48 o 96 pocillos (Greiner BioOne). Las células se precultivaron durante 4-6 h a 37

°C para permitir la unión de las células a las placas de cultivo celular antes del inicio del tratamiento. El medio para la siembra en placas se reemplazó por 315 µL o 108 µL de medio de ensayo (MHM, PRIMACYT Cell Culture Technology GmbH, Alemania), después de lo cual se añadieron los conjugados a partir de una solución patrón concentrada 10x en PBS. Las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C y se recolectaron para el análisis de la expresión génica y la viabilidad celular.

Tratamiento de hepatocitos primarios humanos

Se descongelaron hepatocitos primarios humanos conservados criológicamente (Cytes Biotechnologies S.L., España) en medio de descongelación de hepatocitos (Cytes Biotechnologies S.L., España). Las células se suspendieron de nuevo en medio para la siembra en placas de hepatocitos (Cytes Biotechnologies S.L., España). Las células se sembraron en placas recubiertas con colágeno-I con una densidad de 215 600 células/pocillo o 66 600 células/pocillo para las placas de 48 o 96 pocillos (Greiner BioOne). Las células se precultivaron durante 4-6 h a 37 °C para permitir la unión de las células a las placas de cultivo celular antes del inicio del tratamiento. El medio para la siembra en placas se reemplazó por 315 µL o 108 µL de medio de mantenimiento (Cytes Biotechnologies S.L., España), después de lo cual se añadieron los conjugados a partir de una solución patrón concentrada 10x en PBS. Las placas se incubaron durante 72 h a 37 °C y se recolectaron para el análisis de la expresión génica y la viabilidad celular.

Aislamiento de ARN y análisis de la expresión génica de hepatocitos primarios humanos y de ratón

El ARN de las células se aisló utilizando la solución TRI Reagent® (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La conversión en ADNc se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad) utilizando protocolos estándar. Los niveles de expresión de *ApoB* y los niveles de genes constitutivos de hepatocitos específicos se determinaron utilizando ensayos de PCR cuantitativos en tiempo real (qRT-PCR) utilizando iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) y Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza) con cebadores de ADN específicos, que se enumeran en la Tabla A4. El análisis se realizó mediante el método ΔC_t para determinar la expresión de *ApoB* respecto a 2 ARNm de control constitutivos específicos de hepatocitos. Cada reacción del análisis se realizó por triplicado.

Tabla A4. Cebadores utilizados en el análisis de qPCR de hepatocitos primarios de ratón

ApoB#02	Directo	GCTAACACTAAGAACCAGAAGATC [SEQ ID NO: 13]
	Inverso	TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [SEQ ID NO: 14]
PPIA	Directo	GCGGCAGGTCCATCTACG [SEQ ID NO: 15]
	Inverso	GCCATCCAGCCATTGAGTC [SEQ ID NO: 16]
Mm SDHA	Directo	GAGGAAGCACACCCTCTCAT [SEQ ID NO: 17]
	Directo	GGAGCGGATAGCAGGAGGTA [SEQ ID NO: 18]

Tolerabilidad y eficacia *in vivo* de los conjugados de GalNAc trivalente en un modelo de C57BL/6J

- Administración de dosis y fase *in vivo*. En cada grupo, se administraron dosis a 8 ratones macho C57BL/6J para los grupos de tratamiento y 14 en el grupo de control de vehículo, aproximadamente 6-7 semanas en la llegada y 8-9 semanas en la dosificación. Los compuestos, formulados en PBS, o PBS solo (vehículo) de acuerdo con la Tabla A5, se suministraron con dosis de 5 mL/kg en la vena de la cola (vía intravenosa, iv), con volúmenes de dosis correspondientes a los pesos corporales individuales. Cuando correspondía, se coadministró GalNAc trivalente-SO1861-EMCH con dosis de 5 mL/kg en la vena de la cola (iv) justo después del conjugado de GalNAc trivalente-ApoB. Los animales se pesaron semanalmente y se realizaron observaciones clínicas 2 – 3 veces al día dentro de las primeras 48 h, y al menos una vez al día a partir de entonces hasta el final del estudio.
- Muestreo de suero, tejido hepático y renal. Se tomaron muestras de sangre antes de la dosificación (predosis) y a las 24 h, 72 h, 196 h y 336 h después de la dosis, y se generó suero a partir de la sangre recolectada para el análisis de biomarcadores, utilizando procedimientos estándar. En los puntos de evaluación posteriores a la dosis de 24 h y 72 h, se sacrificaron 3 animales por punto de evaluación y por grupo de tratamiento, y 6 animales en el grupo de control de vehículo para recolectar hemorragias terminales y tejidos hepáticos, renales y de los ganglios linfáticos mesentéricos para análisis adicionales. Al final del estudio a las 336 h, se sacrificaron los 2 animales restantes (4 en el grupo de control) por grupo. La mitad del hígado y un riñón se congelaron y se utilizaron para el análisis de ARN tisular.

Tabla A5. Diseño experimental tolerabilidad y eficacia *in vivo* de conjugados de GalNAc trivalente

Grupo	Conjugado	Dosis [mg/kg]	Dosis relativa de BNA administrada [mg/kg]	Dosis de GalNAc trivalente-SO1861-EMCH coadministrada [mg/kg]
1	PBS (vehículo)	n/a		
2	BNA de ApoB #02	0,1		
3	BNA de ApoB #02	1		
4	BNA de ApoB #02	2		
5	(GalNAc)3- BNA de ApoB #02	0,1		
6	(GalNAc)3- BNA de ApoB #02	1		
7	(GalNAc)3- BNA de ApoB #02	0,1		5
8	(GalNAc)3- BNA de ApoB #02	0,1		5

Análisis de biomarcadores de ARN en tejido hepático

- 5 El ARNm se aisló a partir de tejido hepático congelado utilizando el reactivo TRIzol® (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La conversión en ADNc se realizó utilizando el kit de síntesis de ADNc iScript™ (BioRad). Los niveles de expresión de *ApoB* y los niveles de genes constitutivos hepáticos específicos se determinaron utilizando ensayos de PCR cuantitativos en tiempo real (qRT-PCR) utilizando iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) y Light Cycler 480 (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Suiza) con cebadores de ADN
- 10 específicos, que se enumeran en la Tabla A5. El análisis se realizó mediante el método ΔCt para determinar la expresión de *ApoB* respecto a 2 ARNm de control constitutivos específicos del hígado. Cada reacción del análisis se realizó por triplicado.

Tabla A6. Cebadores utilizados en el análisis de qPCR de tejido hepático

ApoB#02	Directo	GCTAACTAAGAACCAGAAGATC [SEQ ID NO: 13]
	Inverso	TGTCCGTCTAAGGATCCTGC [SEQ ID NO: 14]
Mm RSP17	Directo	GTGCGAGGAGATCGCCATTA [SEQ ID NO: 19]
	Inverso	ATCCGCTTCATCAGATGCGT [SEQ ID NO: 20]
Mm SDHA	Directo	GAGGAAGCACACCCTCTCAT [SEQ ID NO: 17]
	Directo	GGAGCGGATAGCAGGAGGTA [SEQ ID NO: 18]

- 15
- Análisis de biomarcadores de la proteína ApoB**
- Se determinaron los niveles de proteína ApoB en suero de ratón utilizando un ELISA para ApoB (ab230932, Abcam, Cambridge, Reino Unido), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Obsérvese que no se analizaron las
- 20 muestras de los grupos de 1 mg/kg de ApoB#02 y 0,01 mg/kg de (GalNAc)3-ApoB#03 + 5 mg/kg de (GalNAc)3-SO861 a las 336 horas.

Análisis de biomarcadores de colesterol

- 25 Se midió el colesterol LDL en suero de ratón, utilizando un kit de ensayo AU480 de dos pasos específico para colesterol LDL, respectivamente, de Beckman Coulter, con una medición fotométrica de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Análisis de biomarcadores de colesterol

- 30 Se midieron los niveles en suero de alanina-transaminasa (ALT) utilizando un kit de ensayo AU480 de Beckman Coulter (mediciones fotométricas), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de saponina que comprende al menos una saponina unida covalentemente a un ligando para el receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), donde el ligando para ASGPR comprende al menos un resto de *N*-acetilgalactosamina (GalNAc), preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, donde la al menos una saponina se selecciona entre saponinas triterpenoides monodesmosídicas y saponinas triterpenoides bidesmosídicas.

2. Conjugado de saponina según la reivindicación 1, donde la saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona seleccionada del grupo que consiste en:

ácido 2alfa-hidroxioleanólico;
 ácido 16alfa-hidroxioleanólico;
 hederagenina (ácido 23-hidroxioleanólico);
 ácido 16alfa,23-dihidroxioleanólico;
 gipsogenina;
 ácido quillaico;
 21(2-metilbut-2-enoato) y 22-acetato de protoascigenina;
 C-21,22-bis(2-metilbut-2-enoato) de 23-oxobarringtonol;
 C-21(2-metilbut-2-enoato) y 16,22-diacetato de 23-oxo-barringtonol;
 digitogenina
 3,16,28-trihidroxioleanan-12-eno;
 ácido gipsogénico,
 y
 derivados de estos,

preferentemente la saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona seleccionada entre ácido quillaico y gipsogenina o derivados de restos, más preferentemente la estructura del núcleo de aglucona de saponina es ácido quillaico o un derivado de este.

3. Conjugado de saponina según la reivindicación 1 o 2, donde

• la saponina comprende una cadena de sacárido unida a la estructura del núcleo de aglucona, que se selecciona del grupo A:

GlcA-,
 Glc-,
 Gal-,
 Rha-(1→2)-Ara-,
 Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA-,
 Glc-(1→2)-[Glc-(1→4)]-GlcA-,
 Glc-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,
 Xyl-(1→2)-Ara-(1→3)-[Gal-(1→2)]-GlcA-,
 Glc-(1→3)-Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-Glc-(1→4)-Gal-,
 Rha-(1→2)-Gal-(1→3)-[Glc-(1→2)]-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Ara-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Gal-(1→2)-Rha-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Fuc-(1→2)-Glc-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-,
 Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-Gal-(1→2)-Fuc-(1→2)-GlcA-, y

derivados de estos,

o

• la saponina comprende una cadena de sacárido unida a la estructura del núcleo de aglucona, que se selecciona de grupo B:

Glc-,
Gal-,
Rha-(1→2)-[Xyl-(1→4)]-Rha-,
Rha-(1→2)-[Ara-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-,
Ara-,
Xyl-,
Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R1-(→4)]-Fuc- donde R1 es el ácido 4E-metoxicinámico, Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R2-(→4)]-Fuc- es el ácido 4Z-metoxicinámico,
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-3,4-di-OAc-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R3-(→4)]-3-OAc-Fuc- donde R3 es el ácido 4E-metoxicinámico,
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-4-OAc-Fuc-,
(Ara- o Xyl-)(1→3)-(Ara- o Xyl-)(1→4)-(Rha- o Fuc-)(1→2)-[4-OAc-(Rha- o Fuc-)(1→4)]-(Rha- o Fuc-),
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Gal-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
Ara/Xyl-(1→4)-Rha/Fuc-(1→4)-[Glc/Gal-(1→2)]-Fuc-,
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R4-(→4)]-Fuc- donde R4 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R5-(→4)]-Fuc- donde R5 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
6-OAc-Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3-OAc-Rha-(1→3)]-Fuc-,
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-[Qui-(1→4)]-Fuc-,
Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[3,4-di-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
6-OAc-Glc-(1→3)-[Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
Glc-(1→3)-[Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)]-Rha-(1→2)-Fuc-,
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc-,
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[Rha-(1→3)]-4-OAc-Fuc-,
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R6-(→4)]-Fuc- donde R6 es el ácido 5-O-[5-O-Rha-(1→2)-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(13)]-Rha-(1→2)-[R7-(→4)]-Fuc- donde R7 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Api/Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-[Glc-(1→3)]-Rha-(1→2)-[R8-(→4)]-Fuc- donde R8 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R9-(→4)]-Fuc- donde R9 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R10-(→4)]-Fuc- donde R10 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Api-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R11-(→3)]-Fuc- donde R11 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Xyl-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[R12-(→3)]-Fuc- donde R12 es el ácido 5-O-[5-O-Ara/Api-3,5-dihidroxi-6-metilactanoil]-3,5-dihidroxi-6-metilactanoico),
Glc-(1→3)-[Glc-(1→6)]-Gal- y
derivados de estos,

o

• la saponina es un glucósido triterpénico bidesmosídico que comprende una primera cadena de sacárido seleccionada del grupo A unida a la estructura del núcleo de aglucona y que comprende una segunda cadena de sacárido seleccionada del grupo B unida a la estructura del núcleo de aglucona.

5 4. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la saponina:

- se selecciona del grupo que consiste en: saponina de corteza de *Quillaja*, dipsacósido B, saikosaponina A, saikosaponina D, macrantoidina A, esculentósido A, fitolacagenina, escinato, AS6.2, NP-005236, AMA-1, AMR, alfa-hederina, NP-012672, NP-017777, NP-017778, NP-017774, NP-018110, NP-017772, NP-018109, NP-017888, NP-017889, NP-018108, SA1641, AE X55, NP-017674, NP-017810, AG1, NP-003881, NP-017676, NP-017677, NP-017706, NP-017705, NP-017773, NP-017775, SA1657, AG2, SO1861, GE1741, SO1542, SO1584, SO1658, SO1674, SO1832, SO1862, SO1904, QS-7, QS1861, QS-7 api, QS1862, QS-17, QS-18, QS-21 A-apio, QS-21 A-xyl, QS-21 B-apio, QS-21 B-xyl, beta-escina, escina la, saponina de semilla de té I, saponina de semilla de té J, asamsaponina F, digitonina, ácido primula 1 y AS64R, estereoisómeros de estos, derivados de estos y combinaciones de estos, preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en QS-21, un derivado de QS-21, SO1861, un derivado de SO1861, SA1641, un derivado de SA1641, GE1741, un derivado de GE1741 y combinaciones de estos, más preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en un derivado de QS-21, un derivado de SO1861 y combinaciones de estos, más preferentemente la saponina es un derivado de SO1861;

- es un derivado de saponina donde

i. el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona que comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado;

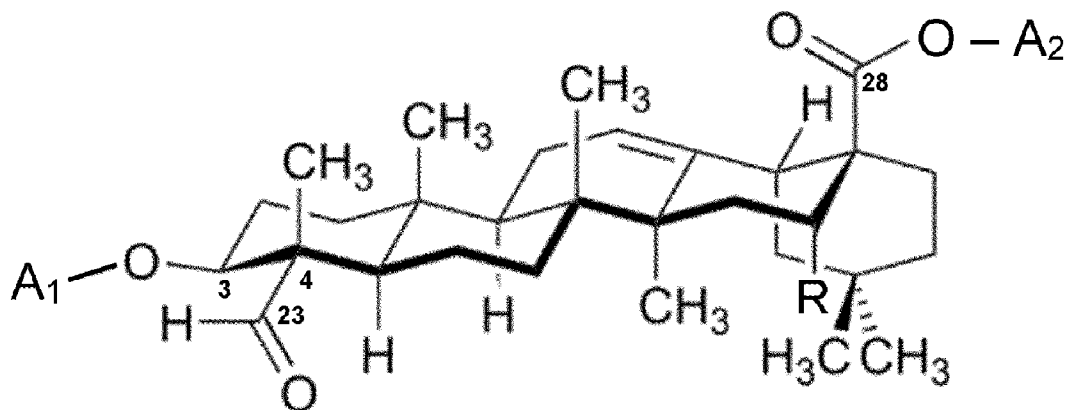
ii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A como se define en la reivindicación 3, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo que ha sido derivatizado;

iii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada de grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo acetoxi (Me(CO)O-) que ha sido derivatizado; o

iv. el derivado de saponina comprende cualquier combinación de derivatizaciones i., ii. e iii., preferentemente cualquier combinación de dos derivatizaciones i., ii. e iii; y/o

- una cualquiera o más de entre: SO1861, SA1657, GE1741, SA1641, QS-21, QS-21A, QS-21 A-api, QS-21 A-xyl, QS-21B, QS-21 B-api, QS-21 B-xyl, QS-7-xyl, QS-7-api, QS-17-api, QS-17-xyl, QS1861, QS1862, saponina de *Quillaja*, *Saponinum album*, QS-18, *Quil-A*, Gyp1, gipsósido A, AG1, AG2, SO1542, SO1584, SO1658, SO1674, SO1832, SO1904, estereoisómeros de estos, derivados de estos y combinaciones de estos, preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en QS-21, un derivado de QS-21, SO1861, un derivado de SO1861, SA1641, un derivado de SA1641, GE1741, un derivado de GE1741 y combinaciones de estos, más preferentemente la saponina se selecciona del grupo que consiste en un derivado de QS-21, un derivado de SO1861 y combinaciones de estos, de la forma más preferida la saponina es un derivado de SO1861.

5. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-4 donde la saponina es un derivado de saponina de la saponina del ácido quillaico o la saponina de gipsogenina según la reivindicación 2 y se representa mediante la molécula 1:



(Molécula 1)

20 donde

A₁ representa hidrógeno, un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado, preferentemente A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, más preferentemente A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, y A₁ comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico;

A₂ representa hidrógeno, un monosacárido o un oligosacárido lineal o ramificado, preferentemente A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada de grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, más preferentemente A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi (Me(CO)O-), tal como uno, dos, tres o cuatro grupos acetoxi, donde al menos uno de entre A₁ y A₂ no es hidrógeno, preferentemente A₁ y A₂ son ambos una cadena de oligosacárido;

y R es hidrógeno en la gipsogenina o hidroxilo en el ácido quillaico;

donde el derivado de saponina corresponde a la saponina representada mediante la Molécula 1 donde hay al menos una, preferentemente una o dos, más preferentemente una, de las siguientes derivatizaciones presentes:

- i. el grupo aldehído en la posición C₂₃ del ácido quillaico o la gipsogenina ha sido derivatizado;
- ii. el grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico de A₁, cuando A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, y A₁ comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico, ha sido derivatizado; y

uno o más, preferentemente la totalidad, de(l) (los) grupo(s) acetoxi de un resto de sacárido o de dos o más restos de sacárido de A₂, cuando A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, y A₂ comprende al menos un grupo B, ha/n sido derivatizado/s;

- preferentemente donde A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, y comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico y donde el grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico de A₁ ha sido derivatizado y/o donde A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi y donde al menos un grupo acetoxi de A₂ ha sido derivatizado;

- más preferentemente donde hay al menos una, preferentemente una o dos, más preferentemente una, de las siguientes derivatizaciones presentes:

- i. el grupo aldehído en la posición C₂₃ del ácido quillaico o la gipsogenina ha sido derivatizado mediante;

- la reducción a un alcohol;

- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona una saponina-Ald-EMCH tal como SO1861-Ald-EMCH o QS-21-Ald-EMCH, donde el grupo maleimida de EMCH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol;

- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[β-maleimidopropiónico] (BMPH), donde el grupo maleimida de BMPH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; o

- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[κ -maleimidoundecanoico] (KMUH), donde el grupo maleimida de KMUH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol;

- ii. el grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico de A₁, cuando A₁ representa una cadena de sacárido seleccionada de, grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, y A₁ comprende o consiste en un resto de ácido glucurónico, ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD) o N-(2-aminoetil)maleimida (AEM), con lo que se proporciona una saponina-Glu-AMPD tal como QS-21-Glu-AMPD o SO1861-Glu-AMPD o una saponina-Glu-AEM tal como QS-21-Glu-AEM o SO1861-Glu-AEM; y
- iii. uno o más, preferentemente la totalidad, de(l) (los) grupo(s) acetoxi de un resto de sacárido o de dos o más restos de sacárido de A₂, cuando A₂ representa una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, y A₂ comprende al menos un grupo acetoxi, ha/n sido derivatizado/s mediante la transformación en un grupo hidroxilo (HO-) mediante desacetilación.

6. Conjugado de saponina según la reivindicación 5, donde A₁ es Gal-(1→2)-[Xyl-(1→3)]-GlcA y/o A₂ es Glc-(1→3)-Xyl-(1→4)-Rha-(1→2)-[Xyl-(1→3)-4-OAc-Qui-(1→4)]-Fuc, preferentemente la saponina representada mediante la Molécula 1 es el ácido 3-O-beta-D-galactopiranosil-(1→2)-[beta-D-xilopiranosil-(1→3)]-beta-D-glucuronopiranosilquillaico 28-O-beta-D-glucopiranosil-(1→3)-beta-D-xilopiranosil-(1→4)- alfa-L-ramnopiranosil-(1→2)-[beta-D-xilopiranosil-(1→3)-4-OAc-beta-D-quinovopiranosil-(1→4)]-beta-D-fucopiranosido, más preferentemente la saponina es una cualquiera o más de: SO1861, GE1741, SA1641 y QS-21, o derivado de estas, más preferentemente SO1861 o derivado de esa.

7. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 4-6, donde la saponina es un derivado de saponina donde

- i. el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona que comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante:

- la reducción a un alcohol;
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N- ϵ -maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona una saponina-Ald-EMCH tal como SO1861-Ald-EMCH o QS-21-Ald-EMCH, donde el grupo maleimida de EMCH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol;
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[β -maleimidopropiónico] (BMPH), donde el grupo maleimida de BMPH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; o
- la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-[κ -maleimidoundecanoico] (KMUH), donde el grupo maleimida de KMUH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol;

ii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD) o N-(2-aminoetil)maleimida (AEM), con lo que se proporciona una saponina-Glu-AMPD tal como QS-21-Glu-AMPD o SO1861-Glu-AMPD o una saponina-Glu-AEM tal como QS-21-Glu-AEM o SO1861-Glu-AEM;

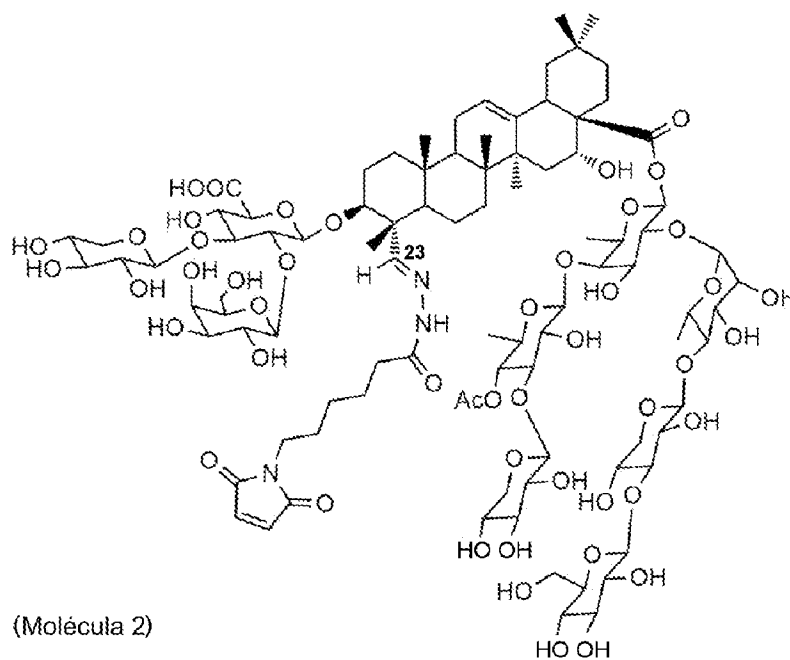
iii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo B, tal como se define en la reivindicación 3, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo acetoxi (Me(CO)O-) que ha sido derivatizado mediante la transformación en un grupo hidroxilo (HO-) mediante desacetilación; o

iv. el derivado de saponina comprende cualquier combinación de derivatizaciones i., ii. e iii., preferentemente cualquier combinación de dos derivatizaciones de las derivatizaciones i., ii. e iii.

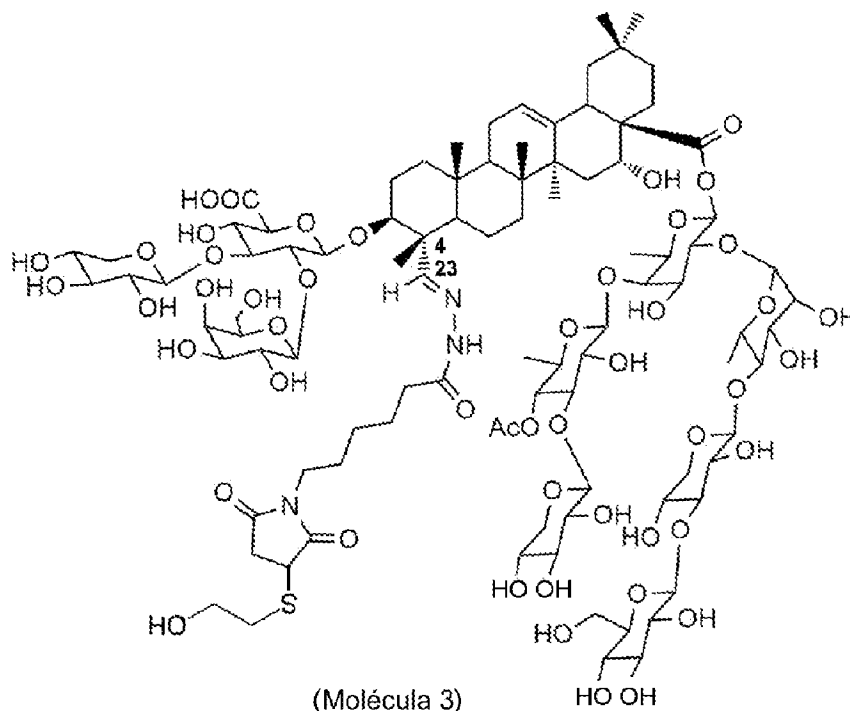
preferentemente, el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona donde la estructura del núcleo de aglucona comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con EMCH donde el grupo maleimida de EMCH está derivatizado opcionalmente mediante la formación de un enlace de tipo tioéter con mercaptoetanol; preferentemente donde la saponina es un derivado de saponina donde

- i. el derivado de saponina comprende una estructura del núcleo de aglucona que comprende un grupo aldehído que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo hidrazona a través de la reacción con la hidrazida del ácido N-ε-maleimidocaproico (EMCH), con lo que se proporciona una saponina-Ald-EMCH tal como SO1861-Ald-EMCH o QS-21-Ald-EMCH;
- ii. el derivado de saponina comprende una cadena de sacárido, preferentemente una cadena de sacárido seleccionada del grupo A, tal como se define en la reivindicación 3, comprendiendo la cadena de sacárido un grupo carboxilo, preferentemente un grupo carboxilo de un resto de ácido glucurónico que ha sido derivatizado mediante la transformación en un enlace de tipo amida a través de la reacción con N-(2-aminoetil)maleimida (AEM), con lo que se proporciona una saponina-Glu-AEM tal como QS-21-Glu-AEM o SO1861-Glu-AEM; o
- iii. el derivado de saponina comprende una combinación de derivatizaciones i. e ii.

8. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la saponina es un derivado de saponina representado por la Molécula 2:

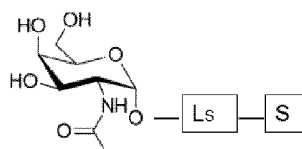


o donde la saponina es un derivado de saponina representado por la Molécula 3:



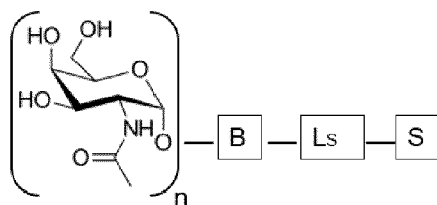
9. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la al menos una saponina y el ligando para ASGPR están unidos covalentemente de forma directa o a través de al menos un conector.

10. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde el resto de GalNAc está unido a la saponina S, preferentemente a través de un conector de saponina L_S, tal como se muestra en la fórmula (II)_S:



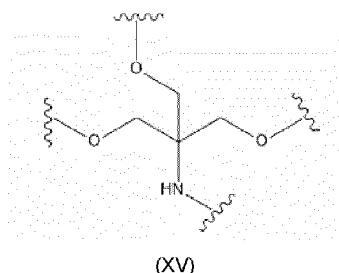
(II)_S

11. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde los restos de GalNAc están unidos covalentemente cada uno por separado a través del oxígeno en la posición "1" del resto de GalNAc a un resto que actúa como puente central B, el cual forma de hecho un puente entre los restos de GalNAc y el resto de saponina, preferentemente a través de un conector del resto de saponina L_S, tal como se muestra en la fórmula (III)_S:

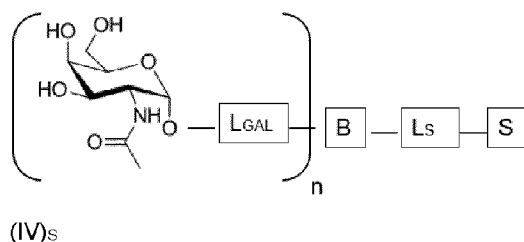


(III)_S

donde n es un número entero superior o igual a 2, preferentemente n es 3, L_S es un conector del resto de saponina y S es el resto de saponina; y donde el resto que actúa como puente es preferentemente un compuesto de fórmula (XV)_S:

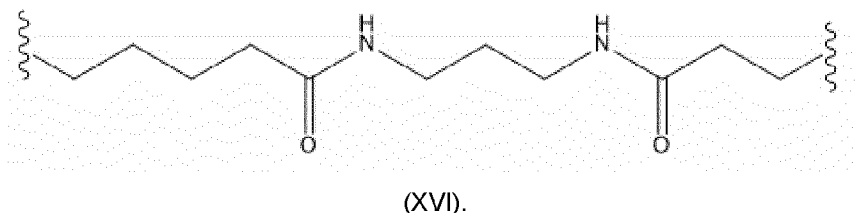


donde los átomos de oxígeno del compuesto de fórmula (XV) están unidos a GalNAc o a los conectores de GalNAc L_{GAL} , y el átomo de nitrógeno del compuesto de fórmula (XV) está unido al conector del resto de saponina L_S ; más preferentemente, donde los restos de GalNAc están unidos al resto que actúa como puente B a través de los conectores de GalNAc L_{GAL} tal como se muestra en la fórmula (IV)_S:



donde n es un número entero superior o igual a 2, preferentemente n es 3, L_S es un conector del resto de saponina y S es el resto de saponina; donde, preferentemente:

- L_{GAL} representa cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente GalNAc al resto que actúa como puente B;
- L_{GAL} comprende 2-25 átomos de carbono, preferentemente 7-15 átomos de carbono, más preferentemente 11 átomos de carbono y donde L_{GAL} comprende al menos uno, preferentemente dos restos de amida; y/o
- L_{GAL} es un compuesto de acuerdo con la fórmula (XVI):

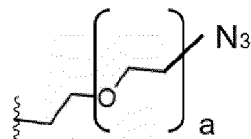


12. Conjugado de saponina según la reivindicación 10 o 11, donde el conector del resto de saponina L_S :

- representa cualquier resto químico adecuado para unir covalentemente una saponina a GalNAc como en la fórmula (II)_S o al resto que actúa como puente B como en la fórmula (III)_S y (IV)_S;
- es el resultado de una reacción de acoplamiento entre al menos un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, donde L_{S1} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y L_{S2} es un precursor del conector del resto de saponina L_S que está unido covalentemente al resto de saponina;
- es el resultado de una reacción de acoplamiento entre al menos un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o al resto que actúa como puente B y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, donde la reacción de acoplamiento se selecciona del grupo que consiste en una cicloadición de azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleofílica de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido, una reacción de un carbonilo del no sea de tipo aldólica y una adición a un doble enlace carbono-carbono, preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición azida-alquino, un acoplamiento de tiol y maleimida, una reacción de Staudinger, una apertura nucleofílica de anillo de electrófilos heterocíclicos de movimiento restringido, más preferentemente donde la reacción de acoplamiento es una cicloadición de azida-alquino o un acoplamiento de tiol y maleimida;

- es el resultado de una reacción de acoplamiento entre un primer precursor L_{S1} unido covalentemente a GalNAc o el resto que actúa como puente B, comprendiendo el primer precursor L_{S1} una azida; y un segundo precursor L_{S2} unido covalentemente al resto de saponina, comprendiendo el segundo precursor L_{S2} un alquino y comprendiendo preferentemente una hidrazona resultante de un acoplamiento de hidrazida/aldehído con un aldehído del resto de saponina; donde, preferentemente:

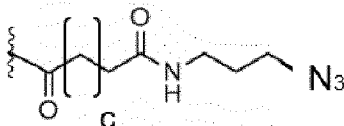
- la estructura para el precursor L_{S1} es la siguiente azida de fórmula (XVII):



(XVII)

donde a representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente a representa un número entero seleccionado entre 1, 2, y 3, más preferentemente a representa 2;

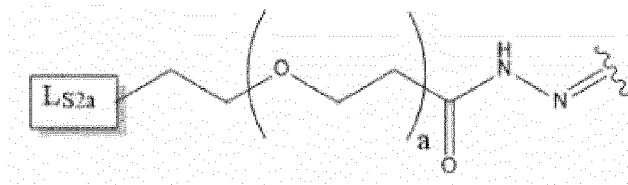
- la estructura para el precursor L_{S1} comprende la siguiente azida de fórmula (XVIII):



(XVIII)

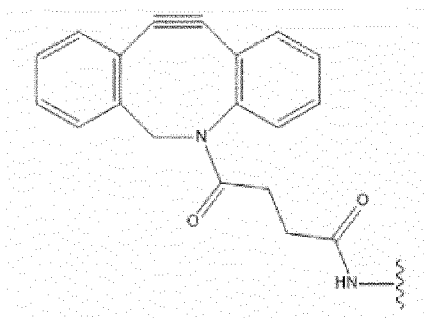
Donde c representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente c representa un número entero en el rango de 5-15, más preferentemente c representa 9;

- la estructura para el precursor L_{S2} comprende la siguiente hidrazona con la fórmula (XIX):



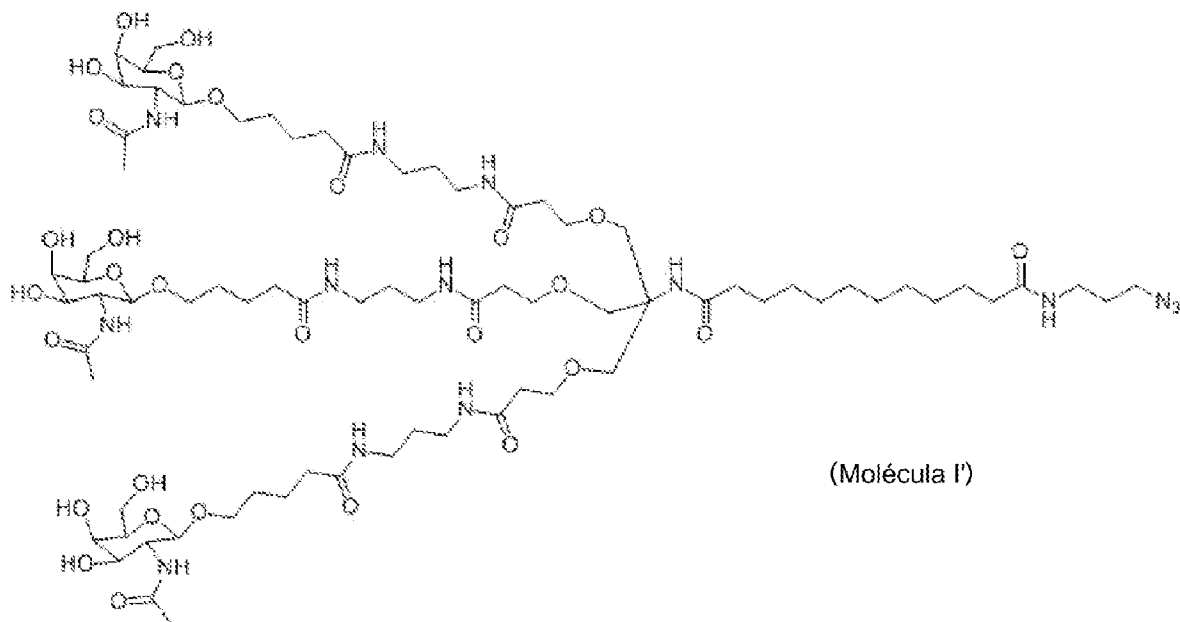
(XIX)

donde a representa un número entero superior o igual a 0, preferentemente a representa un número entero en el rango de 2-6, más preferentemente a representa 4, y donde LS_{2a} representa un resto que contiene alquino, preferentemente donde LS_{2a} comprende menos de 20 átomos de carbono, preferentemente LS_{2a} representa un resto de acuerdo con la fórmula (XX):

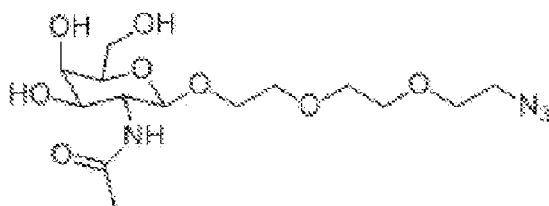


(XX)

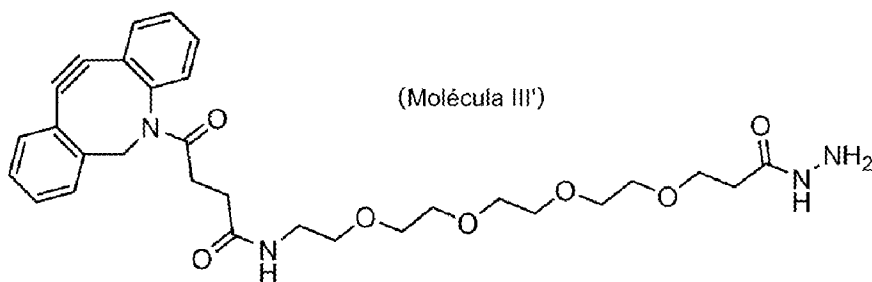
13. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde el ligando para ASGPR es (GalNAc)₃Tris representado mediante la Molécula I':



5 o donde el ligando para ASGPR es mono-GalNAc representado mediante la Molécula II':



14. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-13, donde la al menos una saponina está unida covalentemente a la molécula I' o la Molécula II' según la reivindicación 31 a través de un conector representado por la Molécula III':



donde el resto de hidrazida de la Molécula III' formó un enlace de tipo hidrazona covalente con un grupo aldehído en la saponina, y donde el grupo dibenzociclooctino formó un enlace covalente con el grupo azida de la Molécula I' o la Molécula II'.

15. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-14, donde la al menos una saponina está unida covalentemente al ligando para ASGPR a través de al menos un conector escindible, preferentemente un conector escindible que es objeto de escisión en condiciones ácidas, condiciones reductoras, condiciones enzimáticas y/o condiciones inducidas por la luz, y preferentemente el conector escindible comprende un enlace escindible seleccionado entre un enlace de tipo hidrazona y un enlace de tipo hidrazida objeto de escisión en condiciones ácidas, y/o un enlace sensible a la proteólisis, por ejemplo proteólisis por parte de la cathepsina B, y/o un enlace sensible a la escisión en condiciones reductoras, tal como un puente de disulfuro, más preferentemente un conector escindible que es objeto de escisión *in vivo* en condiciones ácidas tales como, por ejemplo, las presentes en los endosomas y/o lisosomas de células de mamífero, preferentemente células humanas, preferentemente el conector escindible es objeto de escisión *in vivo* a pH 4,0 - 6,5, y más preferentemente a pH $\leq$ 5,5.

16. Conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-15, donde el conjugado comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 16, 32, 64, 128 o 1-100 restos de saponina, o cualquier número de restos de saponina comprendido entre estos, tal como 7, 9, 12 restos de saponina.

17. Combinación farmacéutica que comprende:

- una primera composición farmacéutica que comprende el conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-16 y opcionalmente que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable; y
- una segunda composición farmacéutica que comprende un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR, donde el ligando para ASGPR comprende preferentemente al menos un resto de GalNAc, preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de superficie celular, y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

18. Composición farmacéutica que comprende:

- el conjugado de saponina según cualquiera de las reivindicaciones 1-16;
- un segundo conjugado de una molécula efectora y un ligando para ASGPR donde el ligando para ASGPR comprende preferentemente al menos un resto de GalNAc, preferentemente tres o cuatro restos de GalNAc, más preferentemente el ligando para ASGPR comprende o consiste en (GalNAc)₃Tris, o un tercer conjugado de una molécula efectora y una molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, y que comprende opcionalmente un excipiente farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable.

19. Combinación farmacéutica según la reivindicación 17 o composición farmacéutica según la reivindicación 18, donde la molécula efectora comprende o consiste en al menos uno de una molécula pequeña tal como una molécula farmacológica, una toxina tal como una toxina proteica, un oligonucleótido tal como un BNA, un ácido xenonucleico o un ARNip, una enzima, un péptido, una proteína, o cualquiera combinación de estos, preferentemente, la molécula efectora es una toxina, una enzima o un oligonucleótido.

20. Combinación farmacéutica según la reivindicación 17 o 19 o composición farmacéutica según la reivindicación 18 o 19, donde la molécula efectora:

- es un oligonucleótido seleccionado de cualquier uno o más de: ARN interferente pequeño (ARNip), ARN de horquilla corta (ARNhc), anti-microARN horquillado (miARN), ARN monocatenario, ARN aptámero, ARN bicatenario (ARNbc), anti-microARN (anti-miARN, anti-miR), oligonucleótido antisentido (ASO), ADN, ADN antisentido, ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico con puente (BNA), nucleico con puente de 2'-O,4'-aminoetileno (BNANC), ARNip basado en BNA y oligonucleótido antisentido basado en BNA (BNA-AON);
- es un oligonucleótido seleccionado entre uno cualquiera o más de los siguientes: anti-miARN, un BNA-AON o un ARNip, tal como ARNip basado en BNA, seleccionado entre ARNip modificado químicamente, ARNip estable metabólicamente y modificado químicamente, ARNip estable metabólicamente;
- es un oligonucleótido capaz de, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de silenciar uno cualquiera de los genes: apolipoproteína B (apoB), HSP27, transtiretina (TTR), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), delta-aminolevulinato sintasa 1 (ALAS1), antitrombina 3 (AT3), glicolato oxidasa (GO), componente del complemento C5 (CC5), gen X del virus de la hepatitis B (HBV), gen S del HBV, alfa-1 antitripsina (AAT) y lactato deshidrogenasa (LDH), y/o es un oligonucleótido capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de dirigirse a un miARN anómalo;

- es un oligonucleótido, preferentemente un ARNip tal como un ARNip basado en BNA, o un oligonucleótido antisentido como un oligonucleótido antisentido basado en BNA, por ejemplo un AON basado en un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-aminoetileno, que es capaz, preferentemente cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de silenciar el gen B de la apolipoproteína B (apoB);

- es un oligonucleótido capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de dirigirse a un ARNm implicado en la expresión de cualquiera de las proteínas: apoB, HSP27, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, producto de expresión del gen X de HBV, producto de expresión del gen S de HBV, AAT y LDH, o es capaz, por ejemplo, cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de antagonizar o restaurar una función de miARN tal como inhibir un miARN oncogénico (miR-onco) o suprimir la expresión de un miR-onco;

- es un oligonucleótido, preferentemente un ARNip tal como un ARNip basado en BNA, o un oligonucleótido antisentido tal como un oligonucleótido antisentido basado en BNA, por ejemplo un AON basado en un ácido nucleico con puente de 2'-O,4'-aminoetileno, que es capaz, preferentemente cuando está presente dentro de una célula de mamífero, de dirigirse a un ARNm implicado en la expresión de la proteína apoB; o

- es o comprende una toxina donde la toxina comprende o consiste en al menos una molécula seleccionada entre una cualquiera o más de un péptido, una proteína, una enzima tal como ureasa y Cre-recombinasa, una toxina proteinácea, una proteína que inactiva los ribosomas, y/o una toxina bacteriana, una toxina vegetal, más preferentemente se selecciona entre una cualquiera o más de una toxina viral tal como apoptina; una toxina bacteriana tal como una toxina de Shiga, toxina similar a Shiga, exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (PE) o exotoxina A de PE, toxina diftérica (DT) de longitud completa o truncada, toxina del cólera; una toxina fúngica tal como la alfa-sarcina; una toxina vegetal que incluye proteínas que inactivan los ribosomas y la cadena A de proteínas que inactivan los ribosomas de tipo 2 tal como la diantina, p. ej., diantina-30 o diantina-32, saporina, p. ej., saporina-S3 o saporina-S6, bouganina o un derivado desimmunizado de bouganina de bouganina, toxina A similar a Shiga, proteína antivírica de *Phytolacca americana*, ricina, cadena A de ricina, modicina, cadena A de modicina, abrina, cadena A de abrina, volkensina, cadena A de volkensina, viscumina, cadena A de viscumina; o una toxina animal o humana tal como RNasa de rana, o granzima B o angiogenina de seres humanos, o cualquier fragmento o derivado de estas; preferentemente, la toxina proteica es diantina y/o saporina, y/o comprende o consiste en al menos una de entre una toxina que tiene como diana los ribosomas, una toxina que tiene como diana el factor de elongación, una toxina que tiene como diana la tubulina, una toxina que tiene como diana el ADN y una toxina que tiene como diana el ARN, más preferentemente cualquiera una o más de emtansina, pasudotox, derivado maitansinoide DM1, derivado maitansinoide DM4, monometilauristatina E (MMAE, vedotina), monometilauristatina F (MMAF, mafodotina), una caliqueamicina, N-Acetil-γ-caliqueamicina, un dímero de pirrolobenzodiazepina (PBD), una benzodiazepina, un análogo CC-1065, una duocarmicina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, cisplatino, ciclofosfamida, etopósido, docetaxel, 5-fluorouracilo (5-FU), mitoxantrona, una tubulisina, una indolinobenzodiazepina, AZ13599185, una criptoficina, rizoxina, metotrexato, una antraciclina, un análogo de camptotecina, SN-38, DX-8951f, mesilato de exatecano, forma truncada de una exotoxina de *Pseudomonas aeruginosa* (PE38), un derivado de duocarmicina, una amanitina, α-amanitina, una espliceostatina, una tailanestatina, ozogamicina, tesirina, amberestatina 269 y soravtansina, o derivado de estos.

21. Combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17, 19 o 20 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-20, donde la molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, comprendida en el tercer conjugado, es un ligando para una molécula de la superficie celular o un anticuerpo que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular o al menos un dominio o fragmento de este que comprende el sitio de unión.

22. Combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 19-21 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-21, donde el tercer conjugado es uno cualquiera o más de entre: un conjugado de anticuerpo-toxina, un conjugado de ligando para un receptor-toxina, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un conjugado de ligando para un receptor-fármaco, un conjugado de anticuerpo-ácido nucleico o un conjugado de ligando para un receptor-ácido nucleico.

23. Combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 19-22 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-22, donde la molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, comprendida en el tercer conjugado, es capaz de unirse a una cualquiera de las moléculas de la superficie celular: CD71, CA125, EpCAM(17-1A), CD52, CEA, CD44v6, FAP, EGF-IR, integrina, sindecano-1, integrina vascular alfa-V beta-3, HER2, EGFR, CD20, CD22, receptor de folato 1, CD146, CD56, CD19, CD138, receptor de CD27L, PSMA, CanAg, integrina-alfaV, CA6, CD33, mesotelina, Cripto, CD3, CD30, CD239, CD70, CD123, CD352, DLL3, CD25, efrina A4, MUC1, Trop2, CEACAM5, CEACAM6, HER3, CD74, PTK7, Notch3, FGF2, C4.4A, FLT3, CD38, FGFR3, CD7, PD-L1, CTLA4, CD52, PDGFRA, VEGFR1, VEGFR2, receptor de asialoglicoproteína (ASGPR), preferentemente una cualquiera de entre: HER2, CD71, ASGPR y EGFR, más preferentemente CD71.

24. Combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 19-22 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-23, donde la molécula de unión que comprende un sitio de unión para una molécula de la superficie celular, comprendida en el tercer conjugado, es o comprende uno cualquiera de entre: un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal tal como un anticuerpo monoclonal humano, una IgG, una molécula que comprende o consiste en un anticuerpo de un solo dominio, al menos un dominio V_{HH} , preferible un V_H de camélido, un dominio de un receptor de antígeno nuevo de cadena pesada variable (V_{NAR}), un Fab, un scFv, un Fv, un dAb, un F(ab)2 y un fragmento Fcab.
25. Combinación farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 19-24 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 18-24, para su uso:
- como medicamento.
 - en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o problema de salud en el que interviene un producto de expresión de uno cualquiera o más de los genes: apoB, TTR, PCSK9, ALAS1, AT3, GO, CC5, gen X de HBV, gen S de HBV, AAT y LDH;
 - en el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad o problema de salud en el que interviene un producto de expresión del gen apoB; o
 - en el tratamiento o la profilaxis de un cáncer, una enfermedad infecciosa, una infección vírica, hipercolesterolemia, hiperoxaluria primaria, hemofilia A, hemofilia B, enfermedad hepática relacionada con AAT, porfiria hepática aguda, amiloidosis mediada por TTR, amiloidosis por TTR hereditaria (hATTR), enfermedad mediada por el complemento, infección por hepatitis B o una enfermedad autoinmunitaria.

Fig. 1

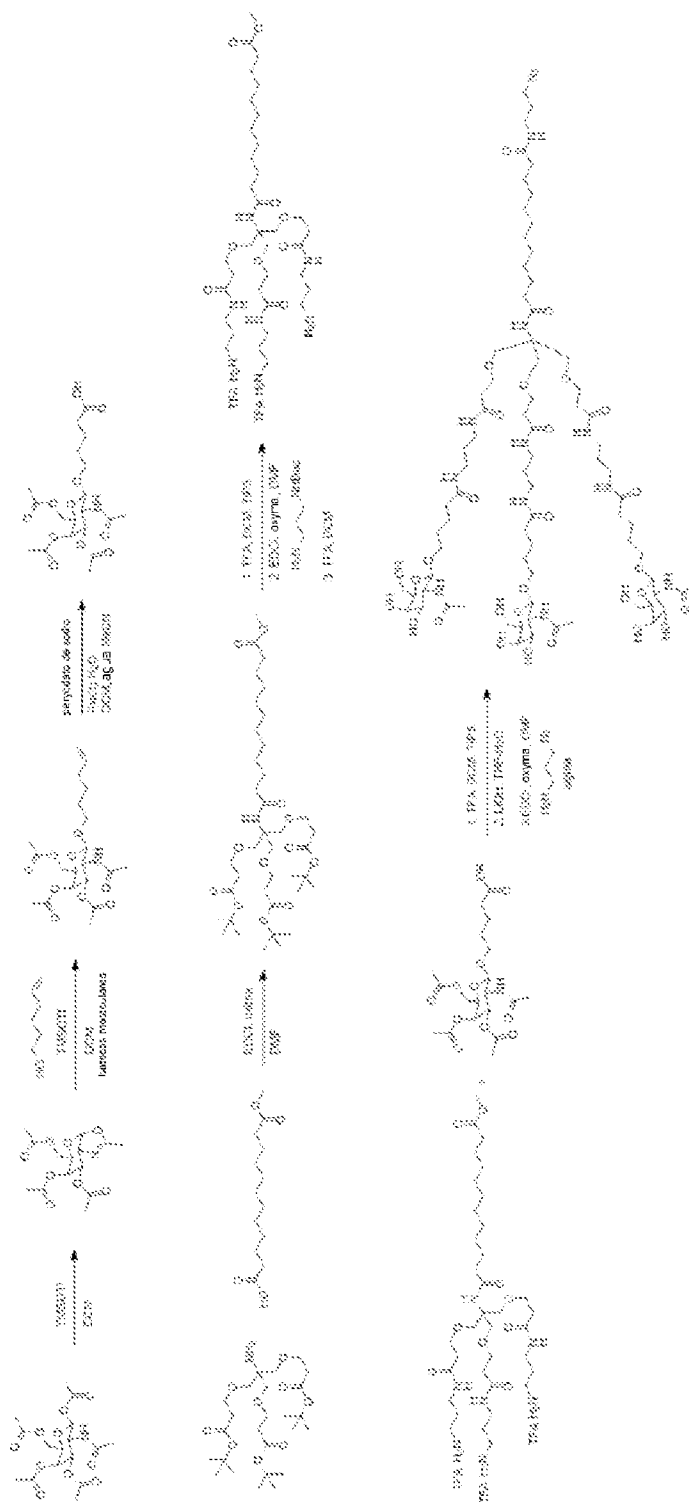


Fig. 2

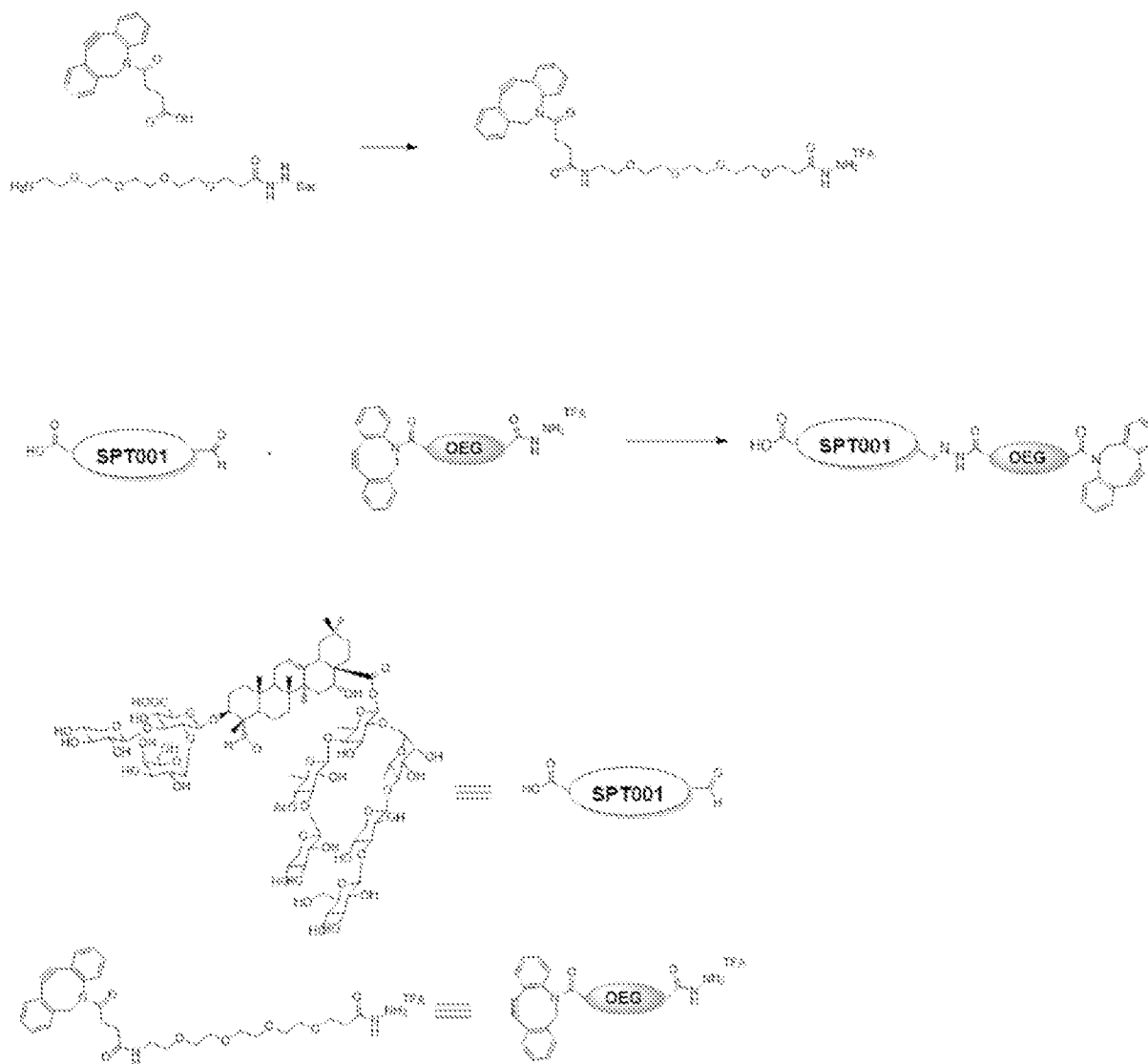


Fig. 3

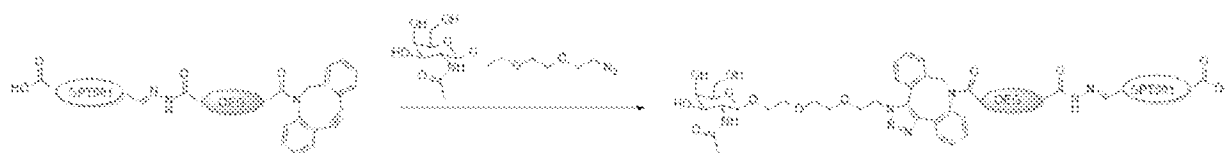


Fig. 4

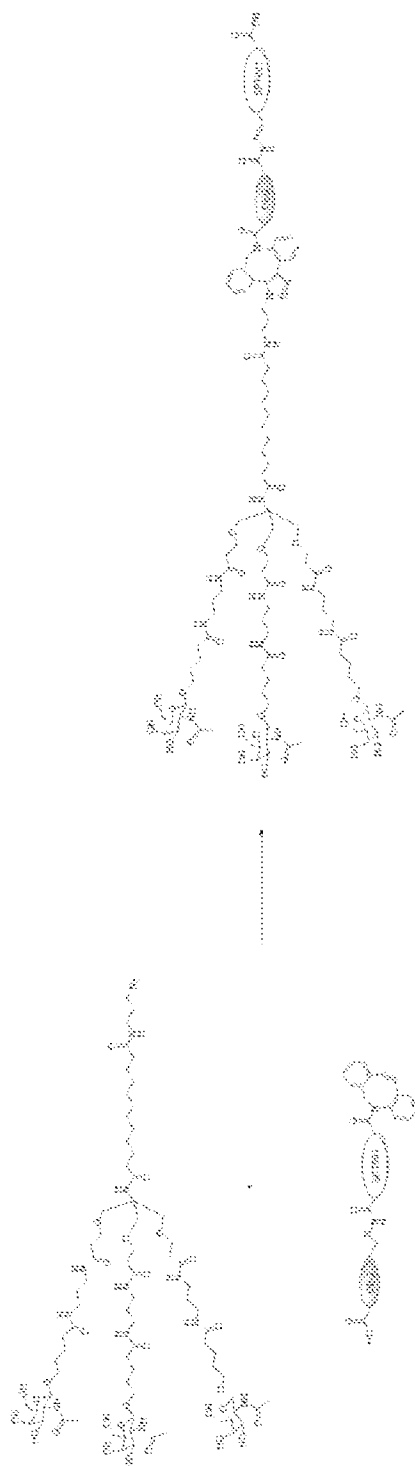


Fig. 5

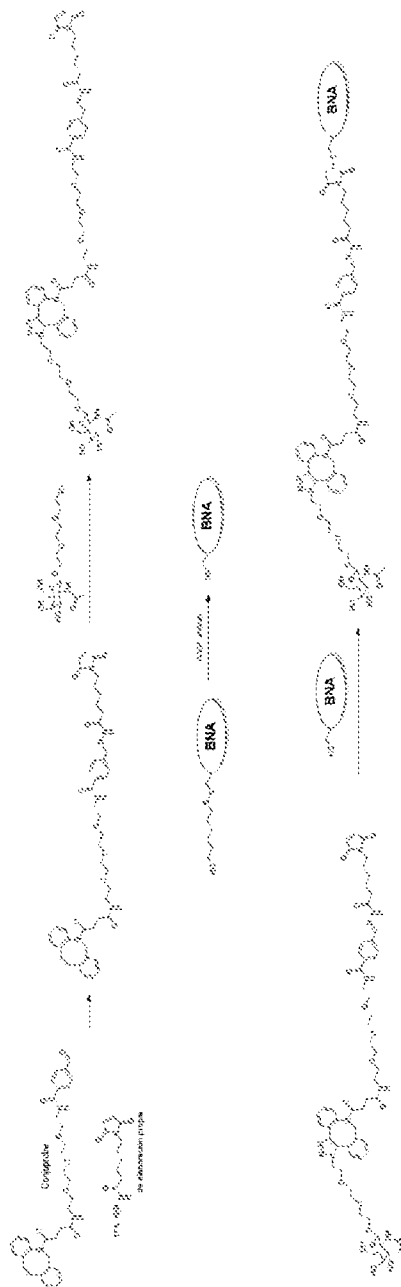


Fig. 6

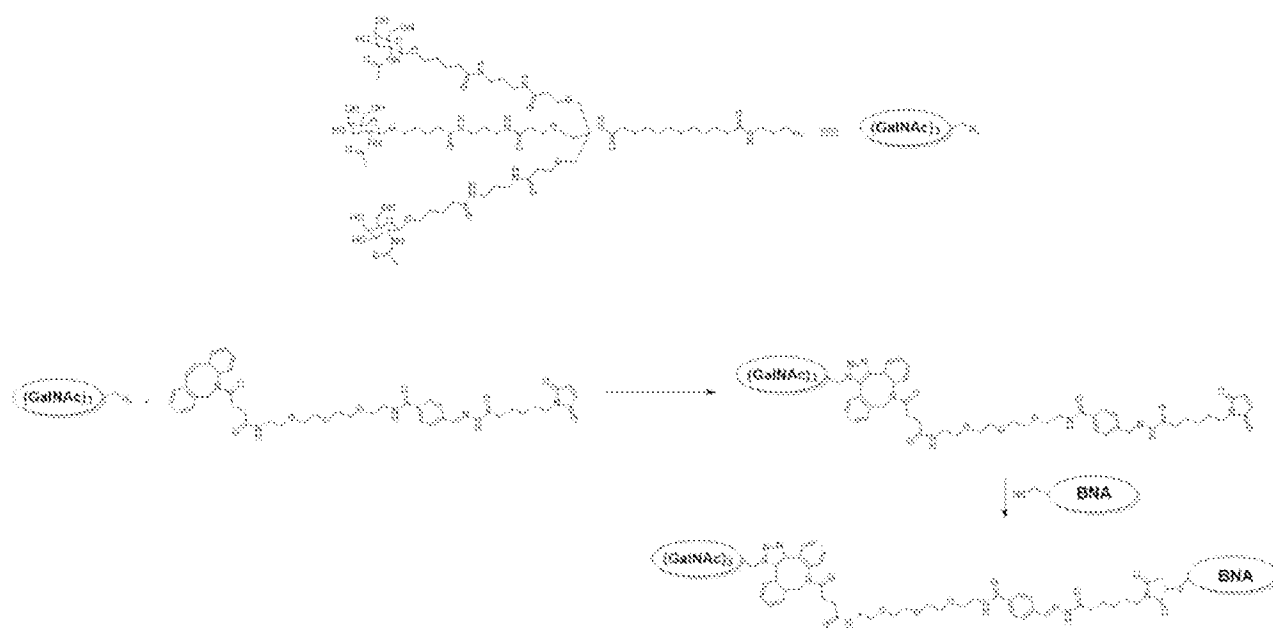


Fig. 7

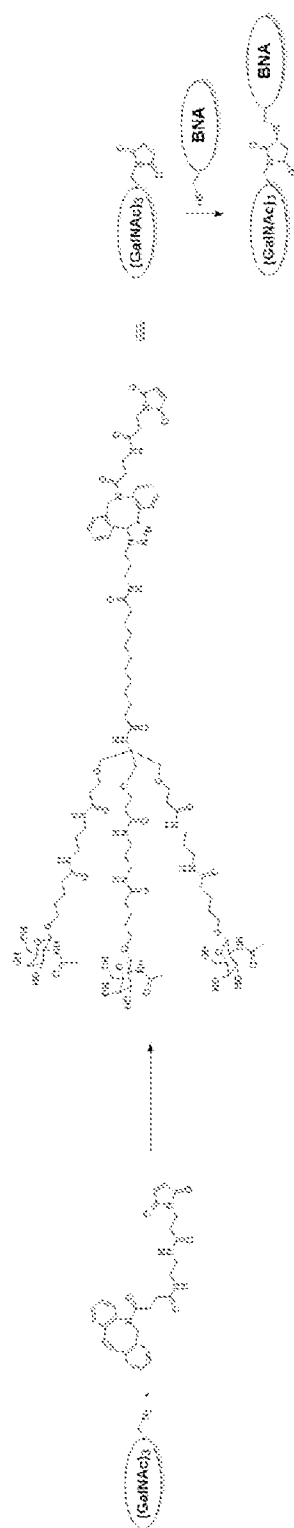


Fig. 8A

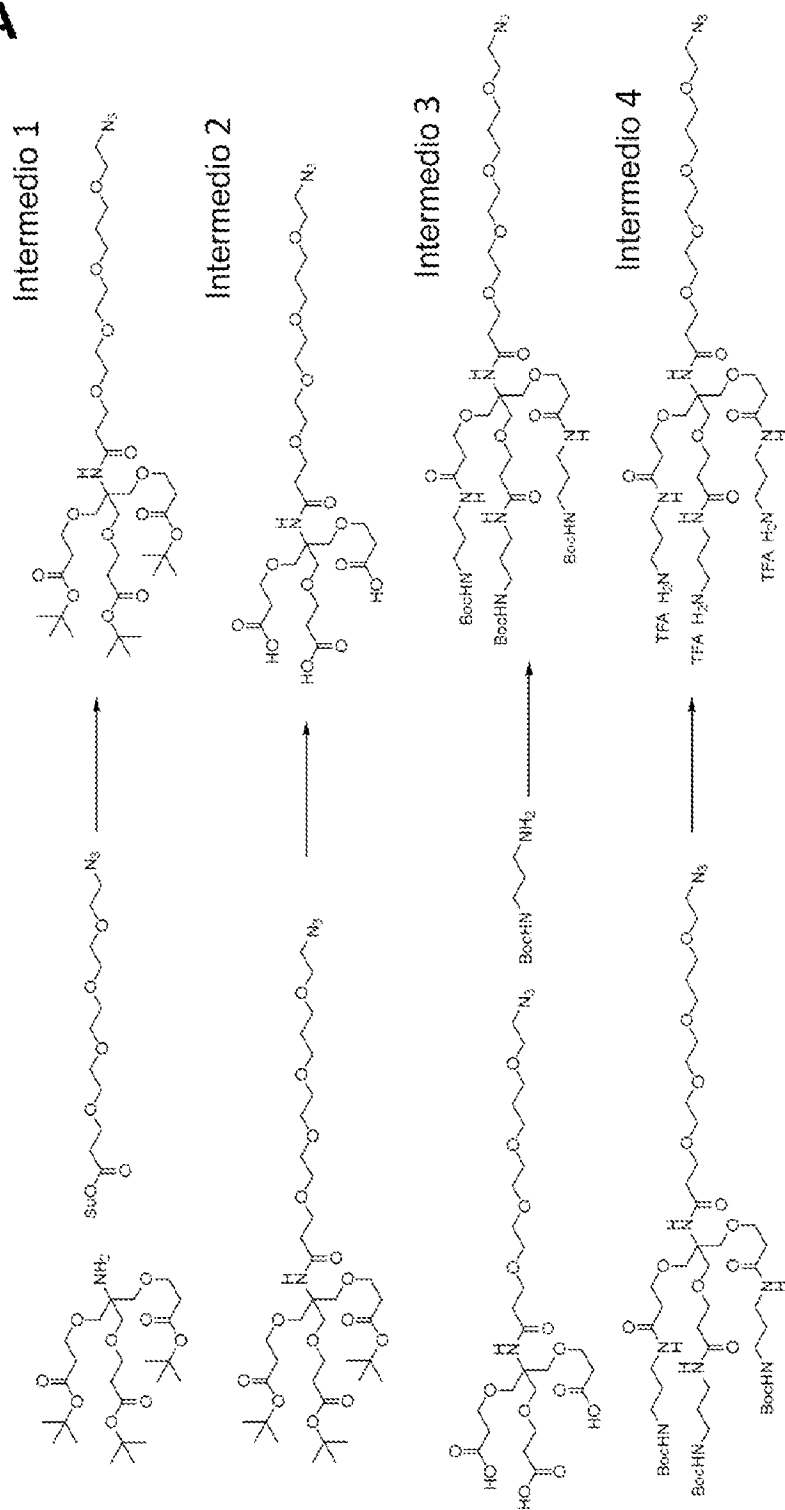


Fig. 8B

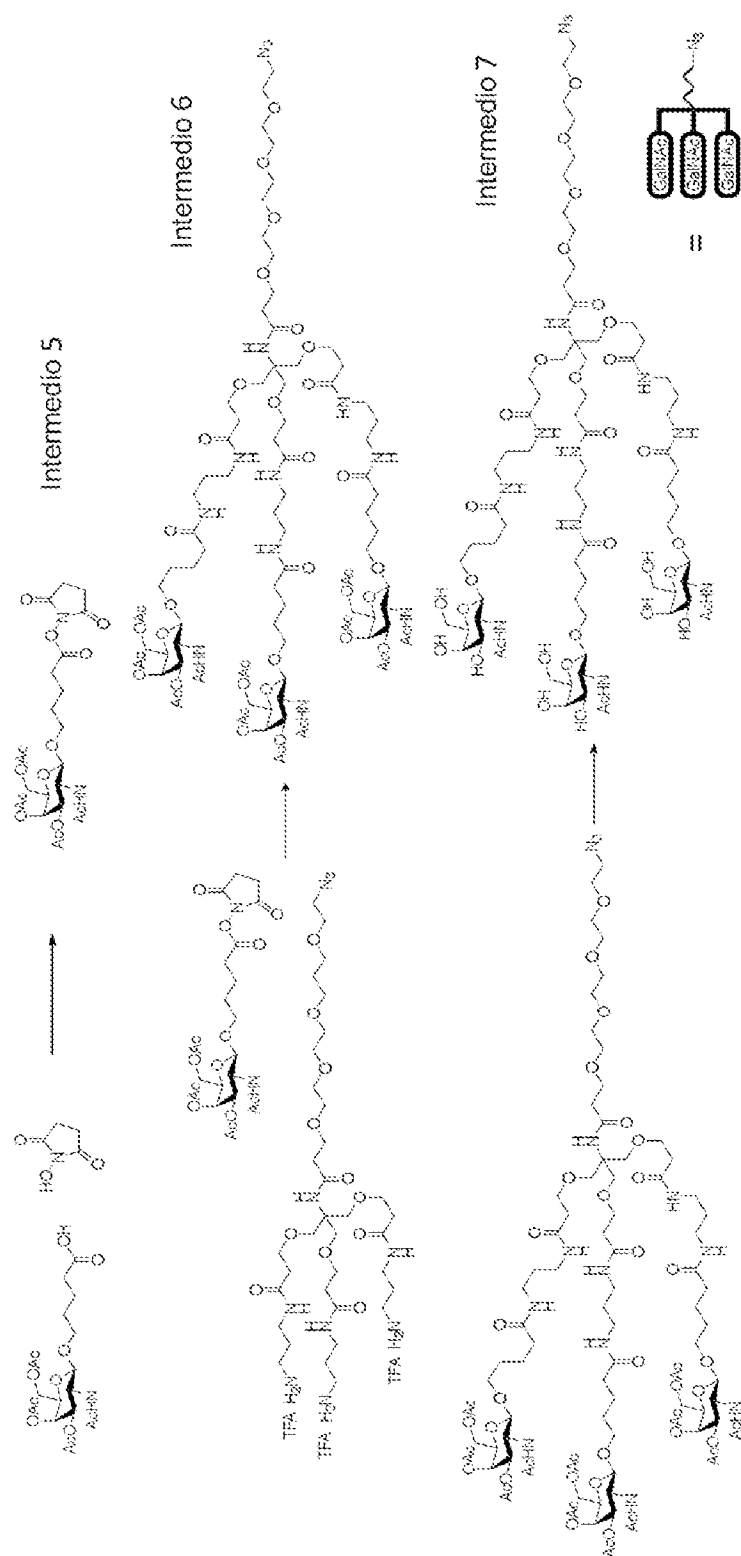


Fig. 9A

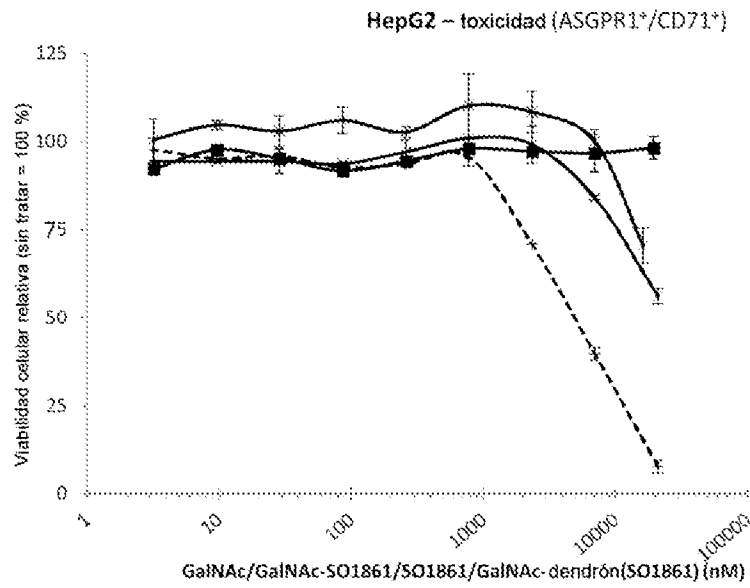


Fig. 9B

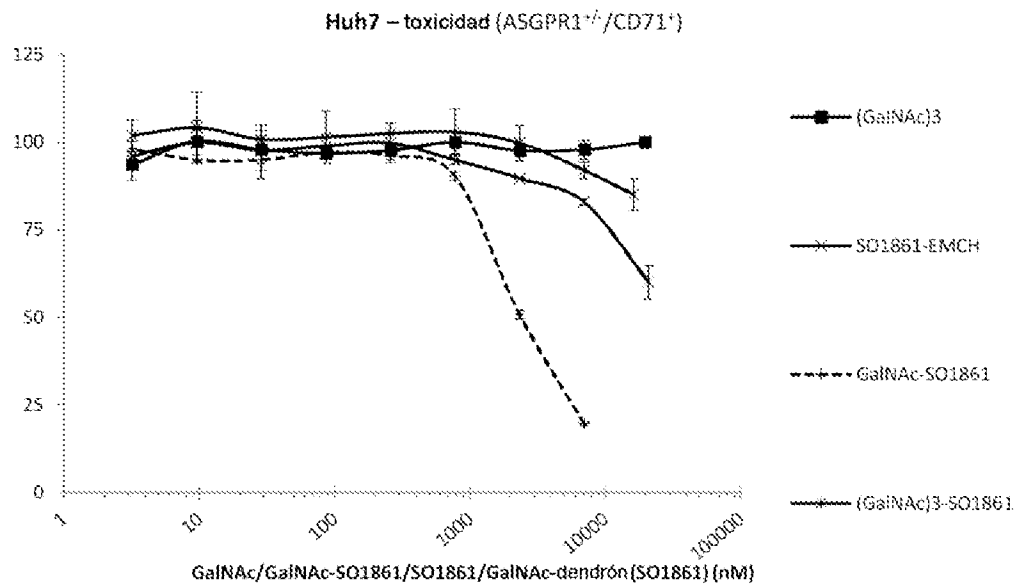


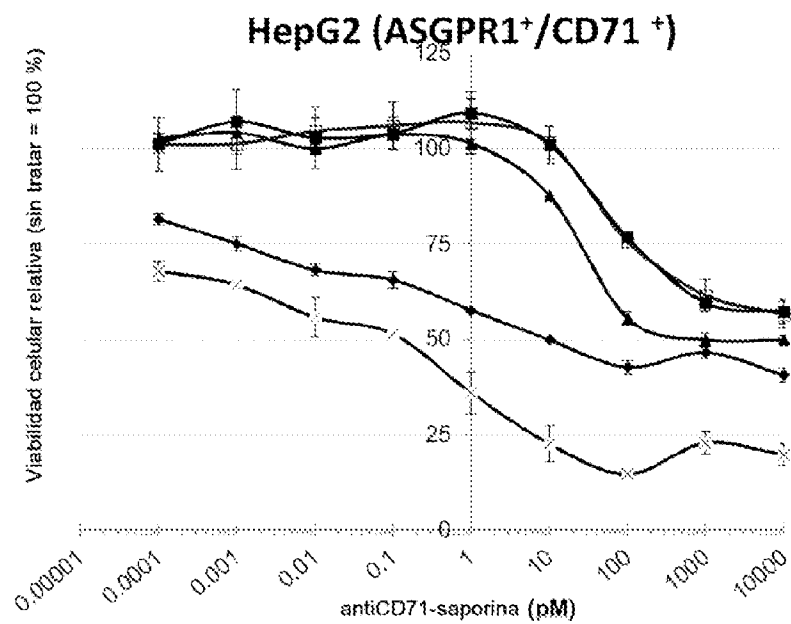
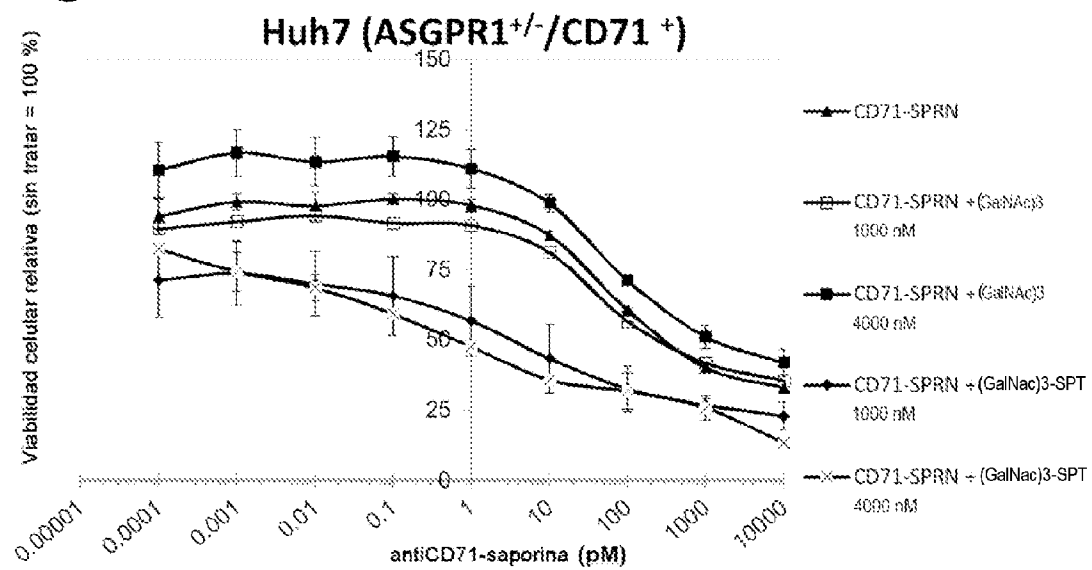
Fig. 10A**Fig. 10B**

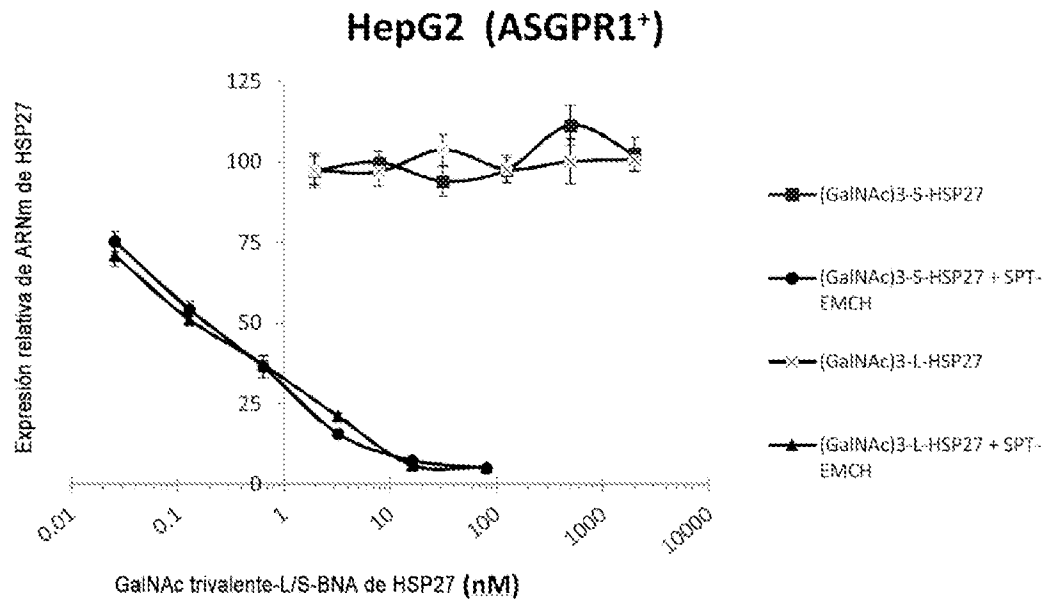
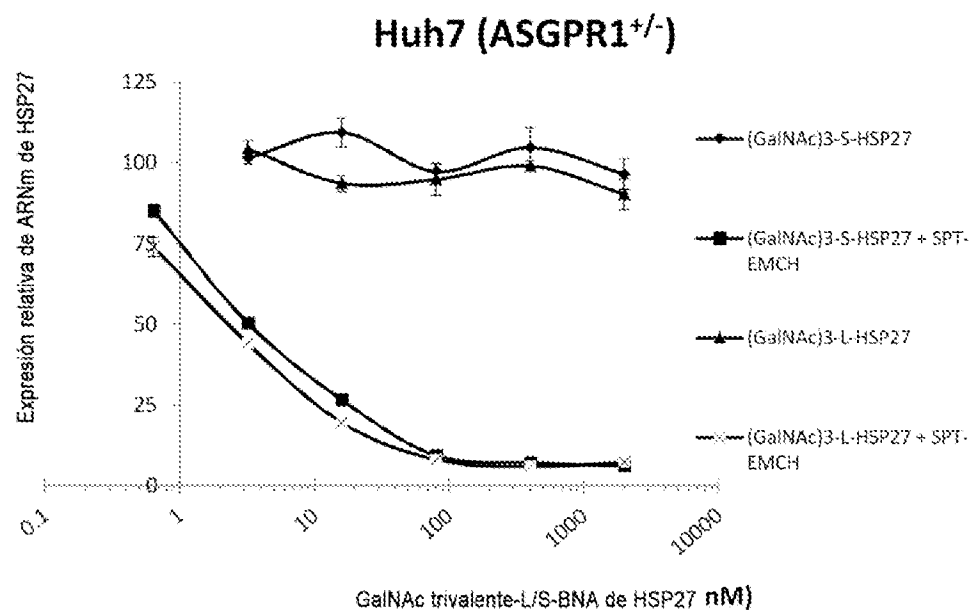
Fig. 11A**Fig. 11B**

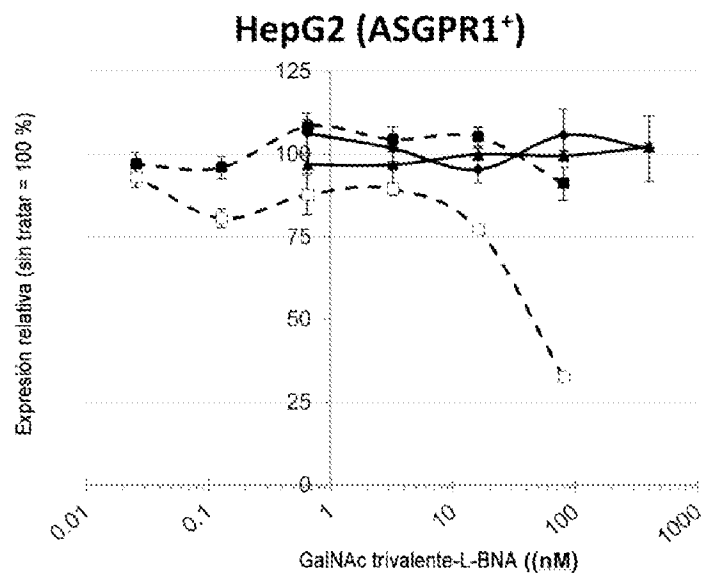
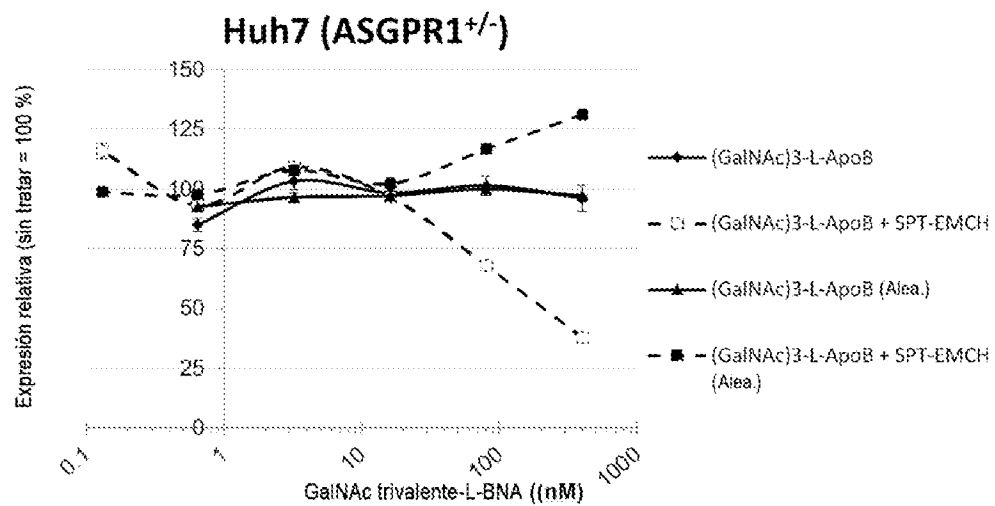
Fig. 12A**Fig. 12B**

Fig. 13A

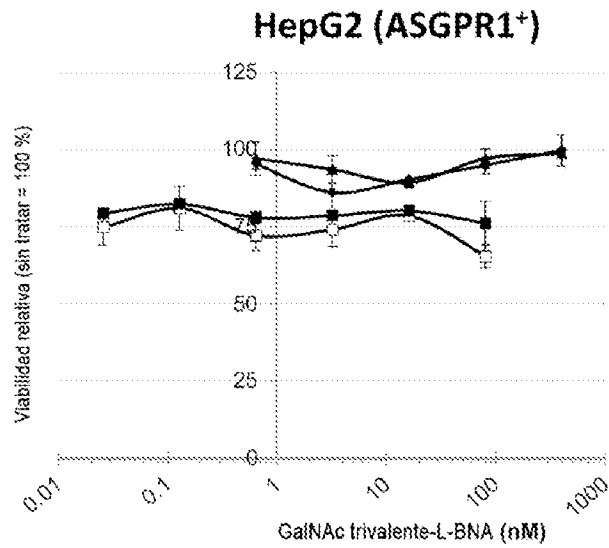


Fig. 13B

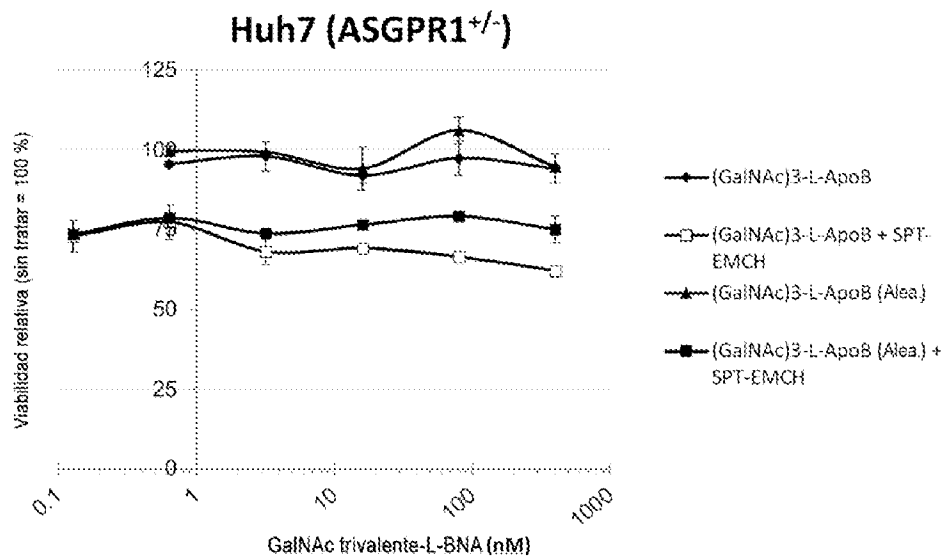


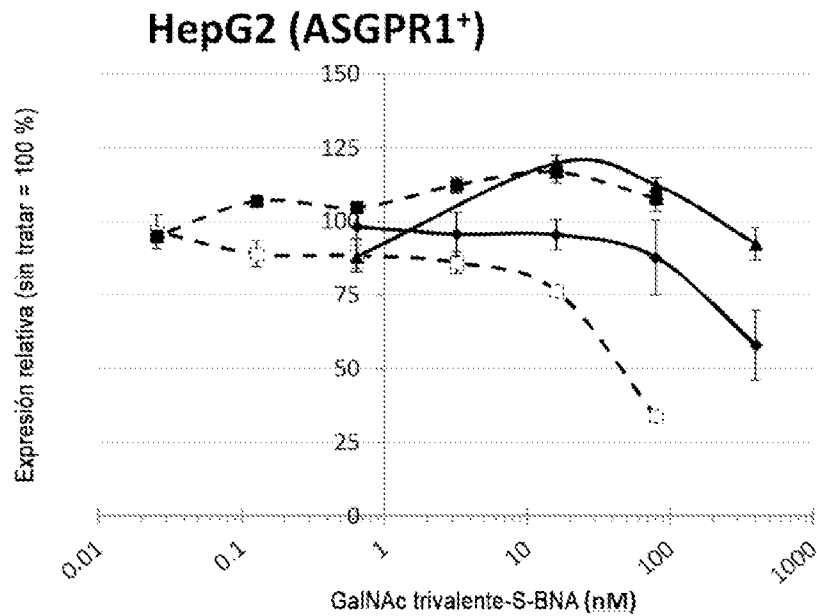
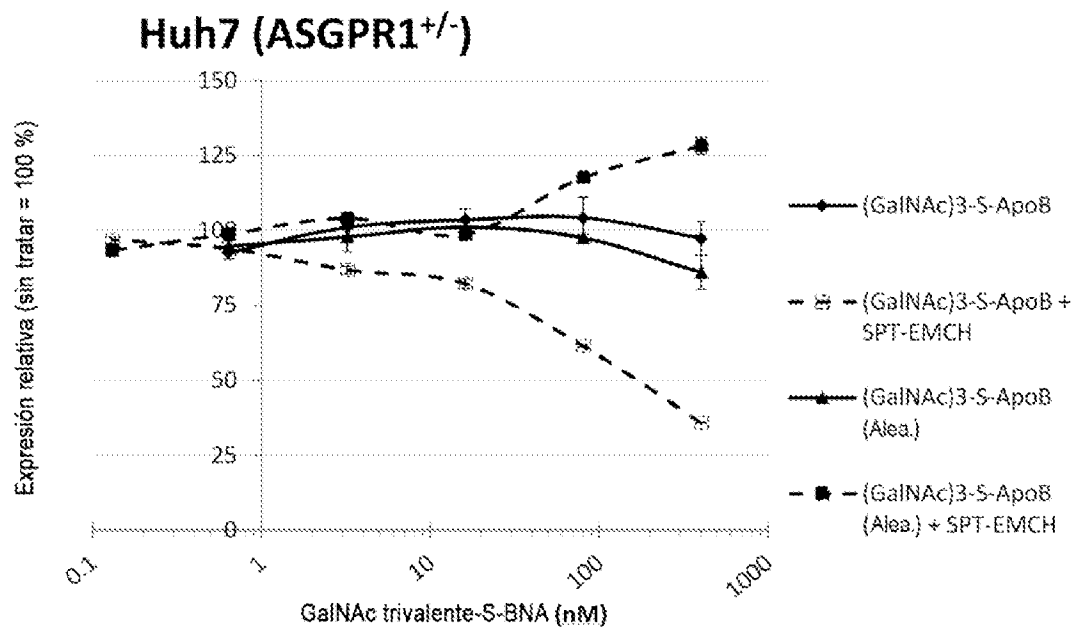
Fig. 14A**Fig. 14B**

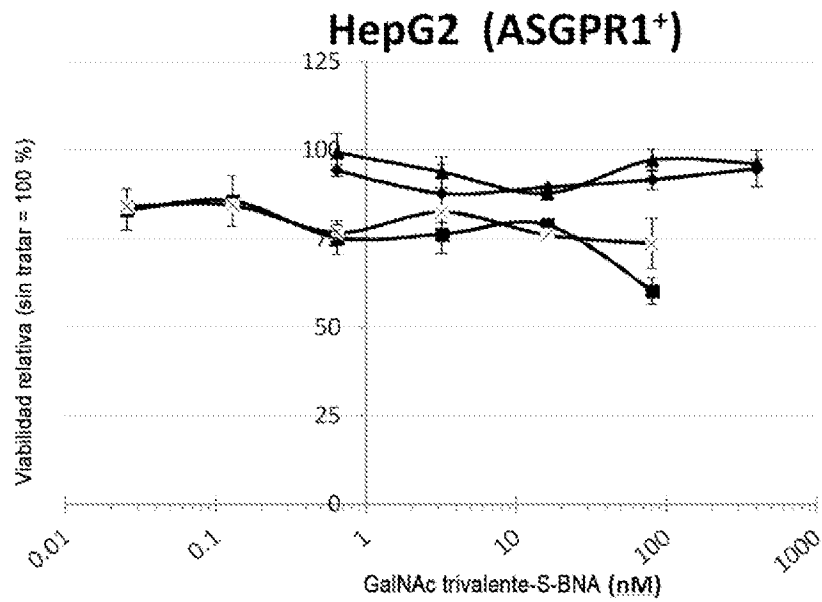
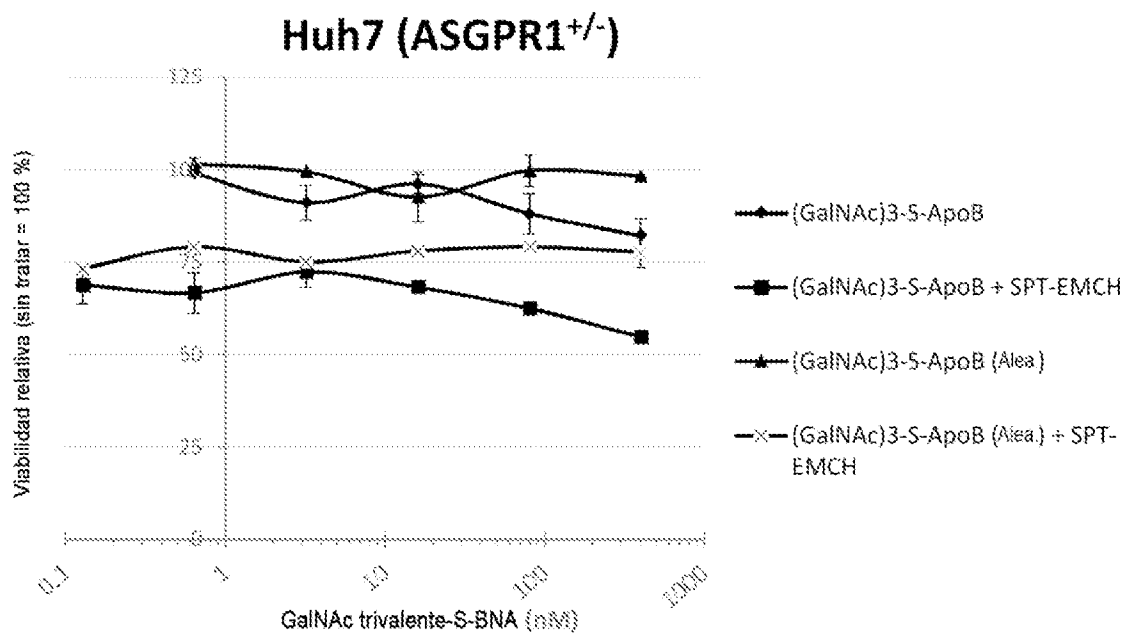
Fig. 15A**Fig. 15B**

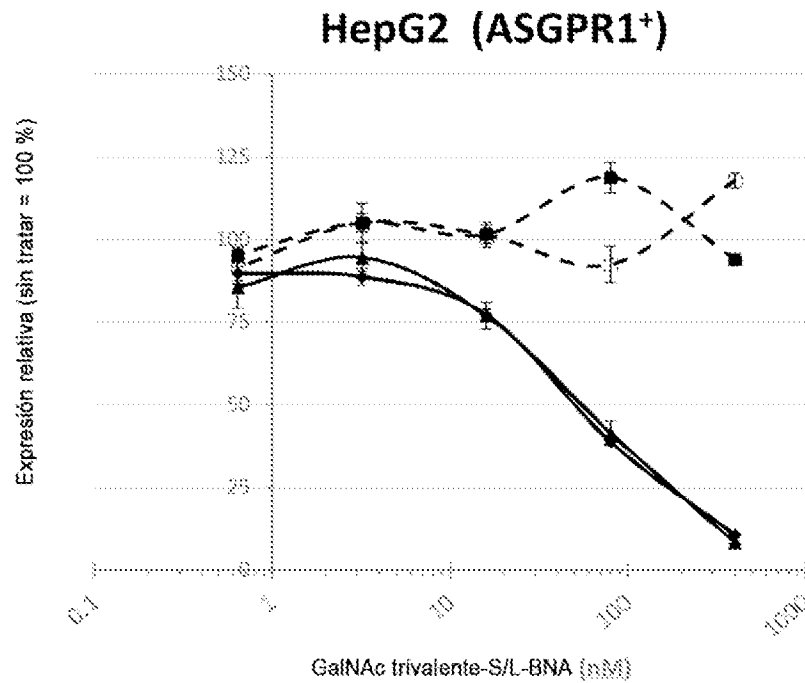
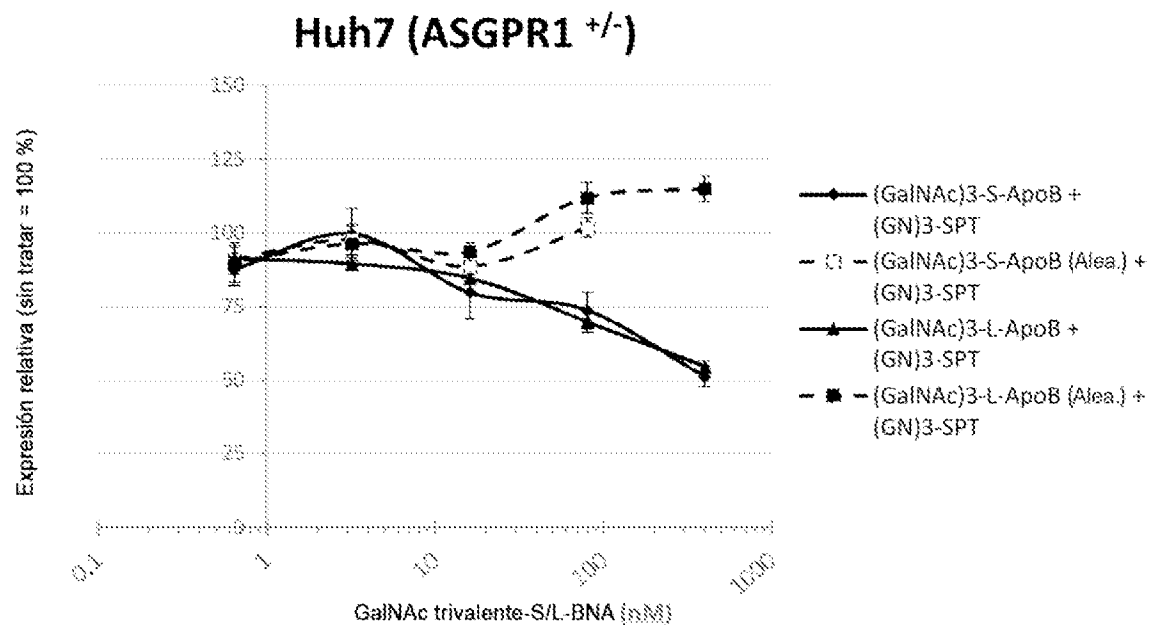
Fig. 16A**Fig. 16B**

Fig. 17A

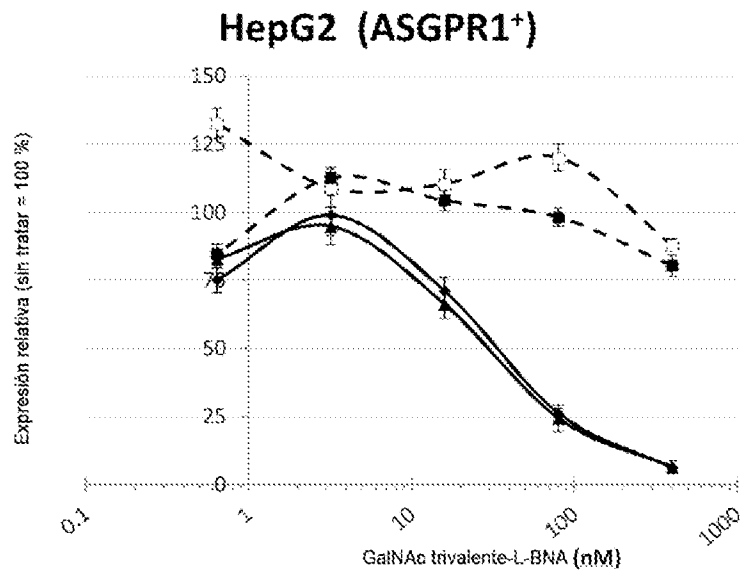


Fig. 17B

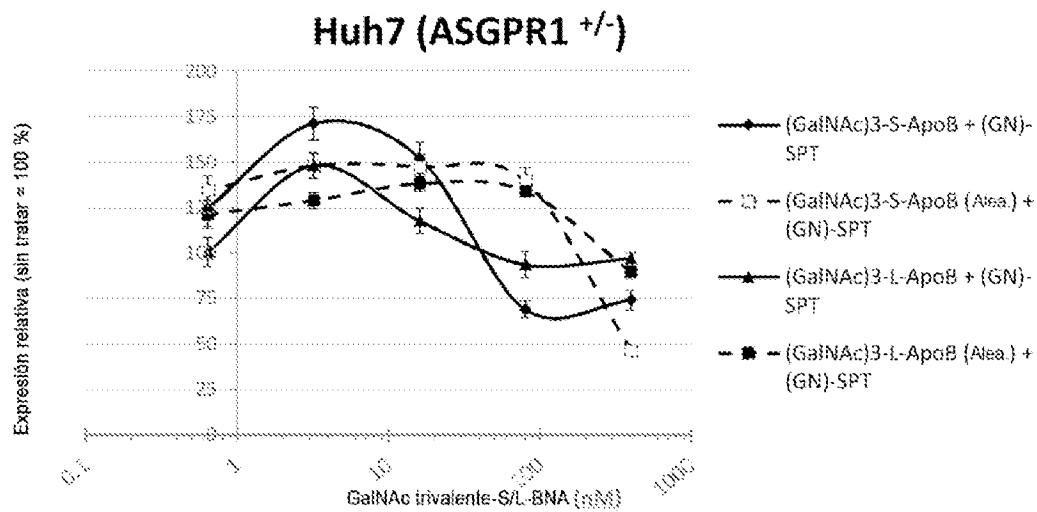


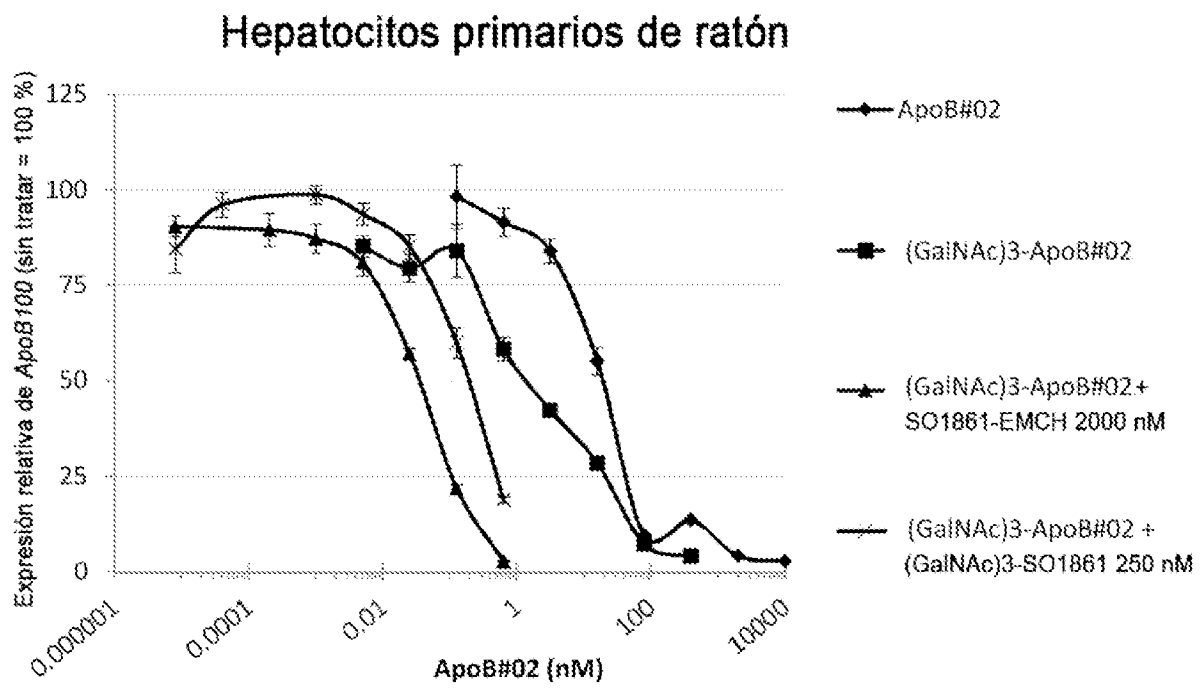
Fig. 18

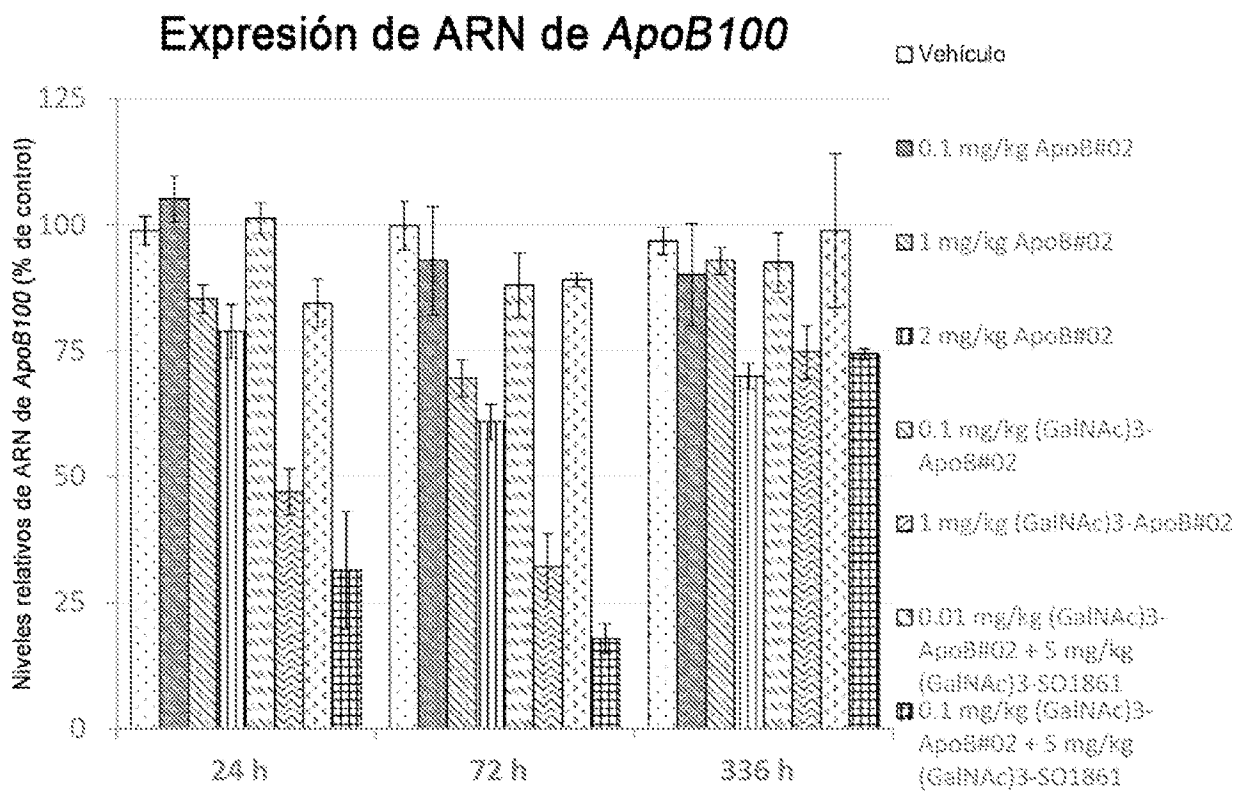
Fig. 19

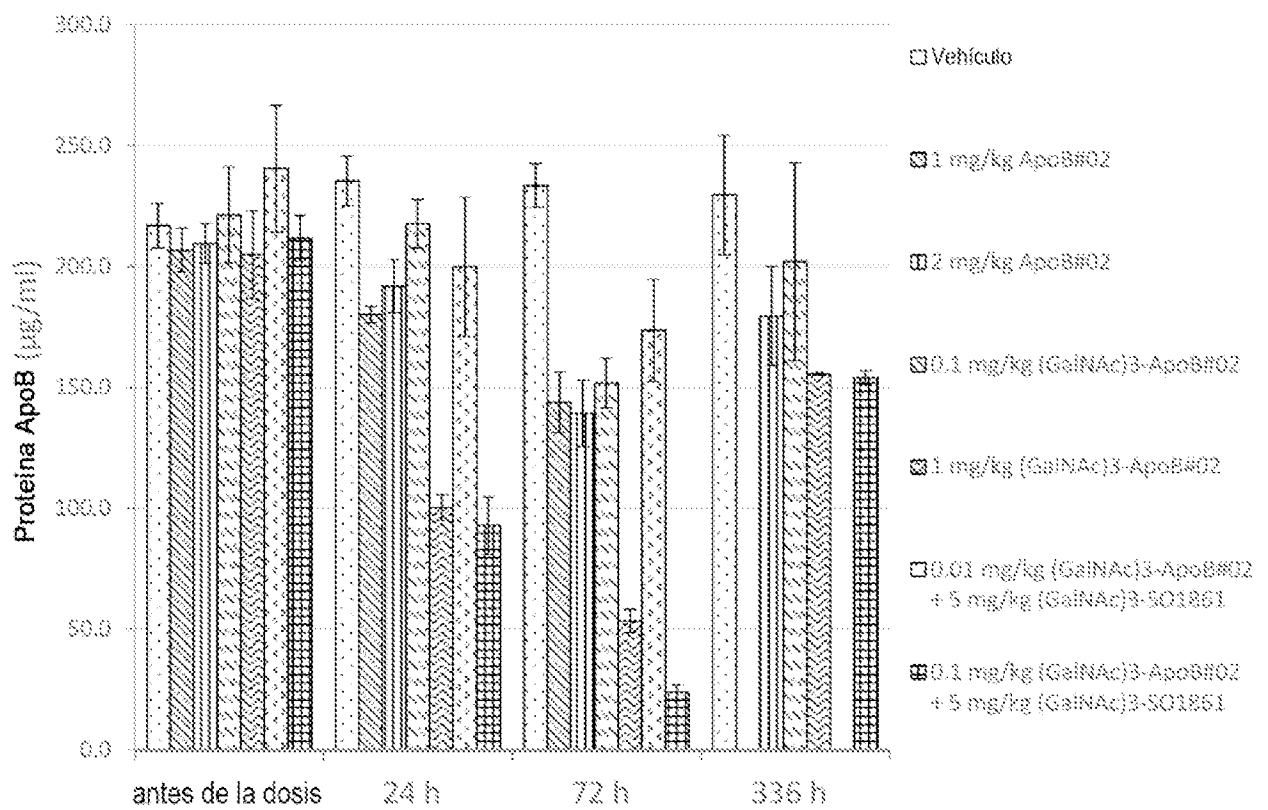
Fig. 20

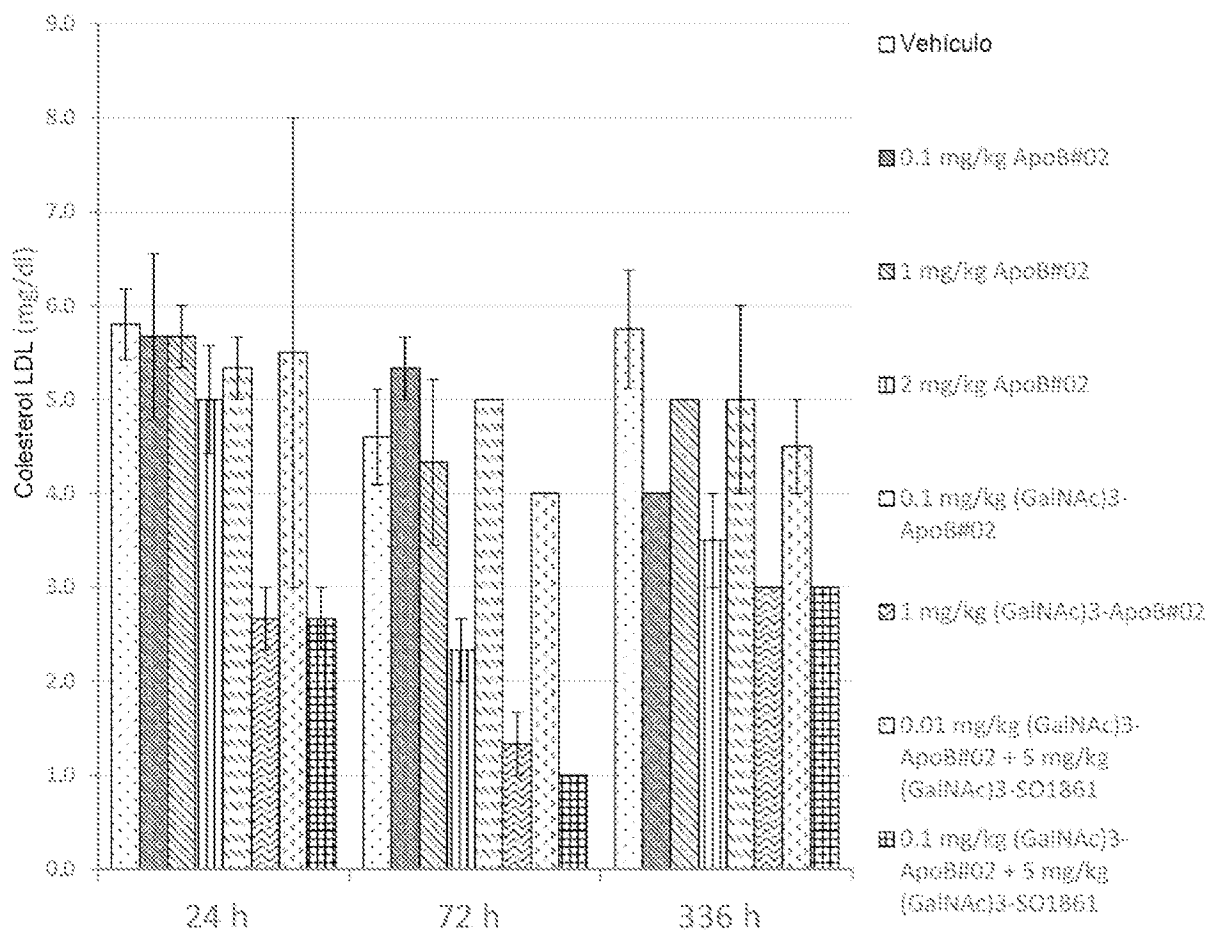
Fig. 21

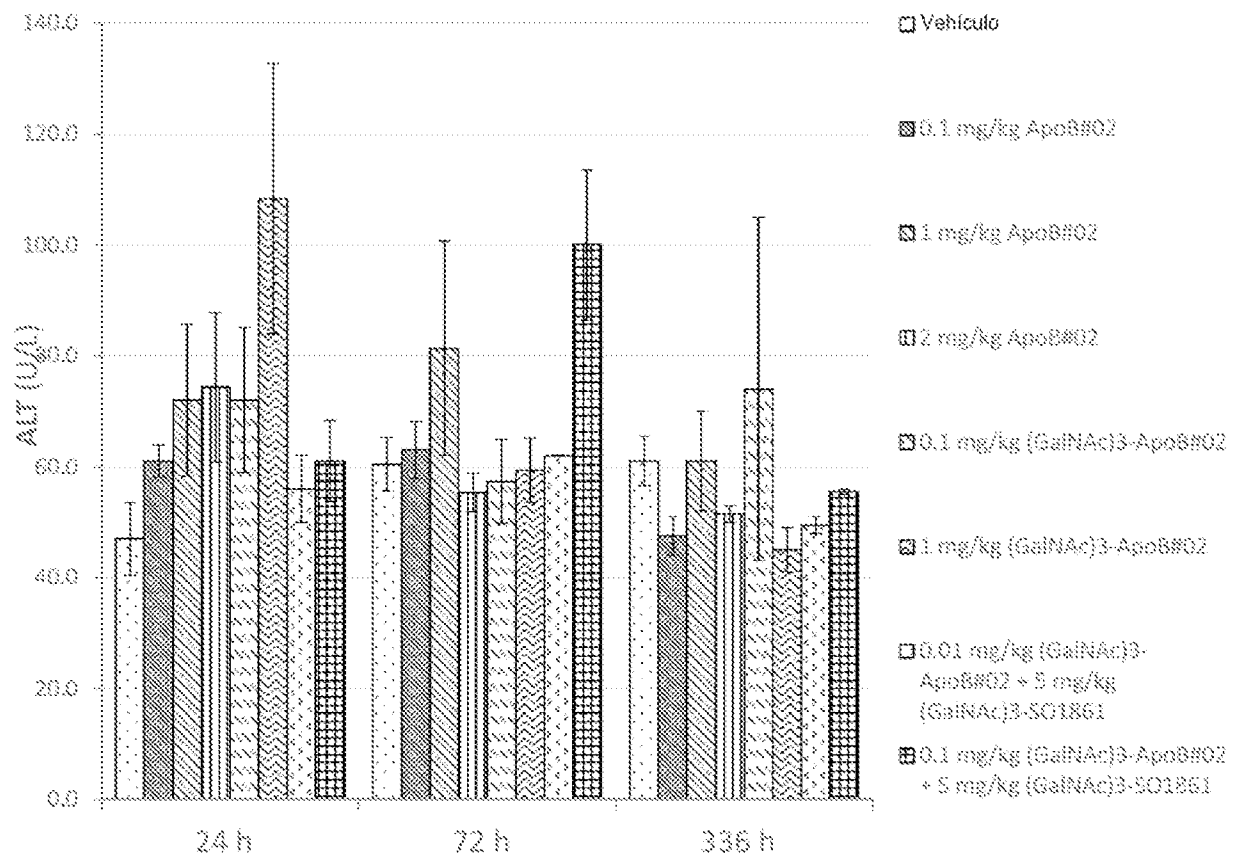
Fig. 22

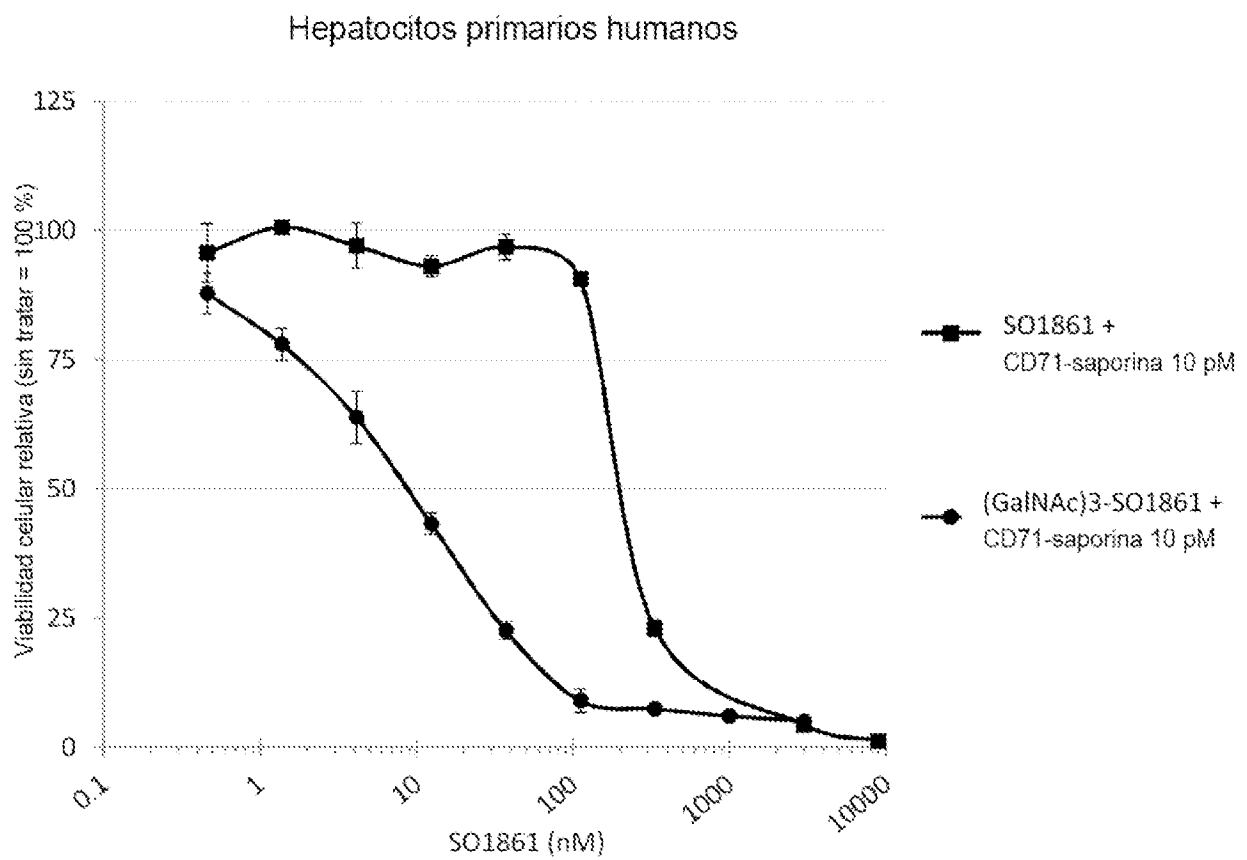
Fig. 23

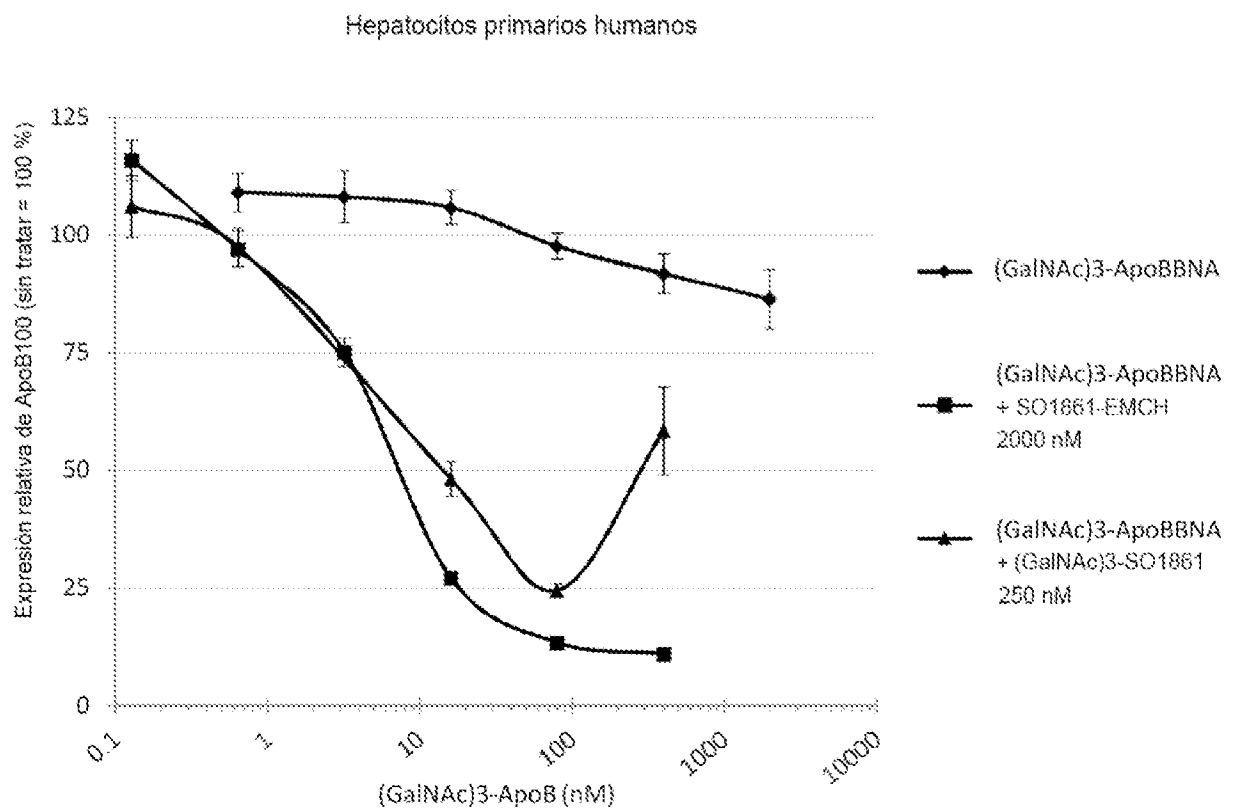
Fig. 24**A**

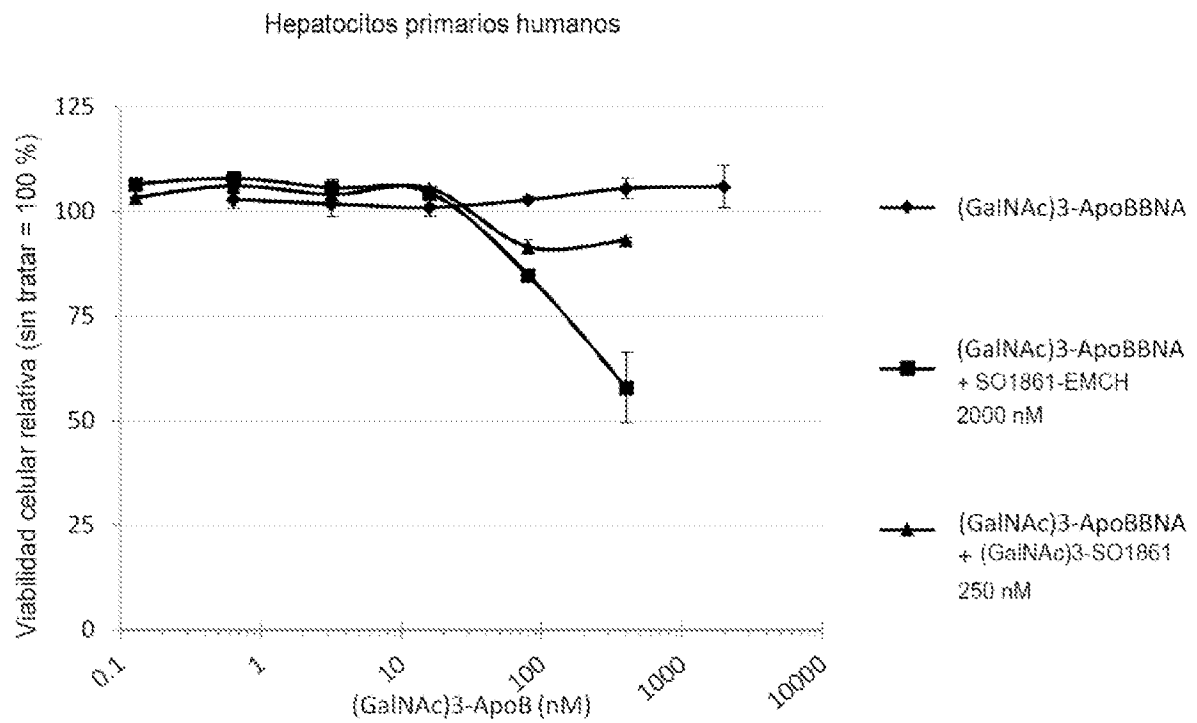
Fig. 24**B**

Fig. 25

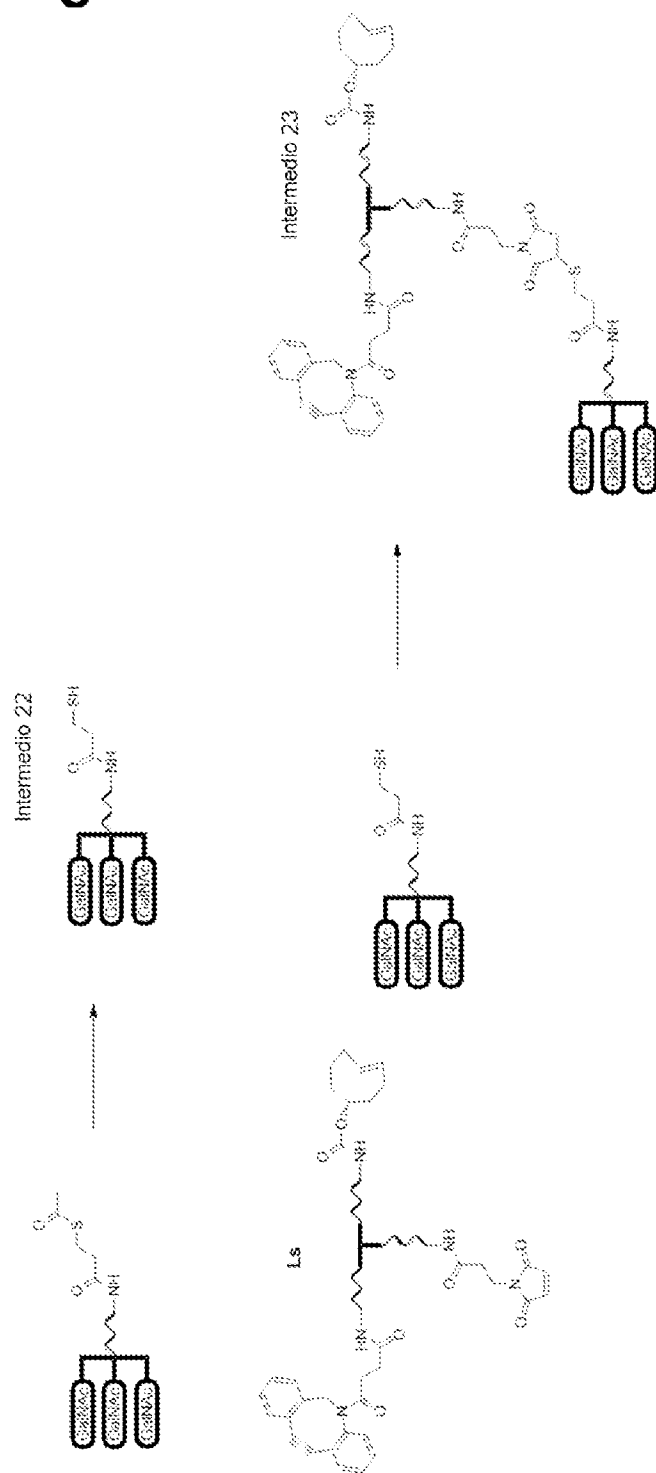


Fig. 26

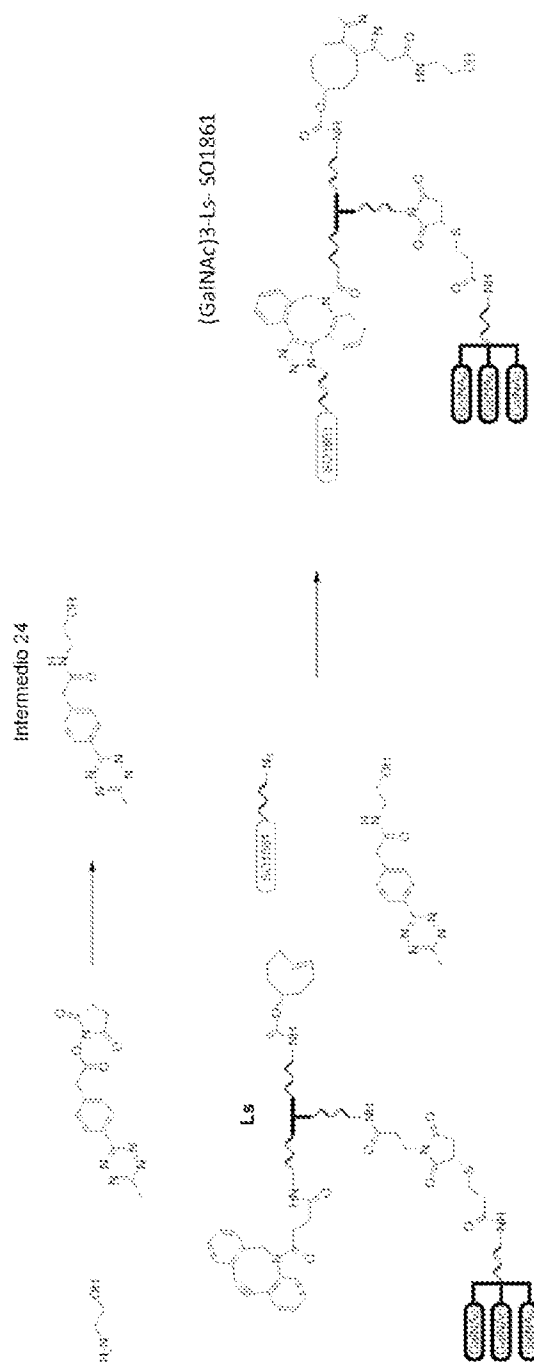


Fig. 27

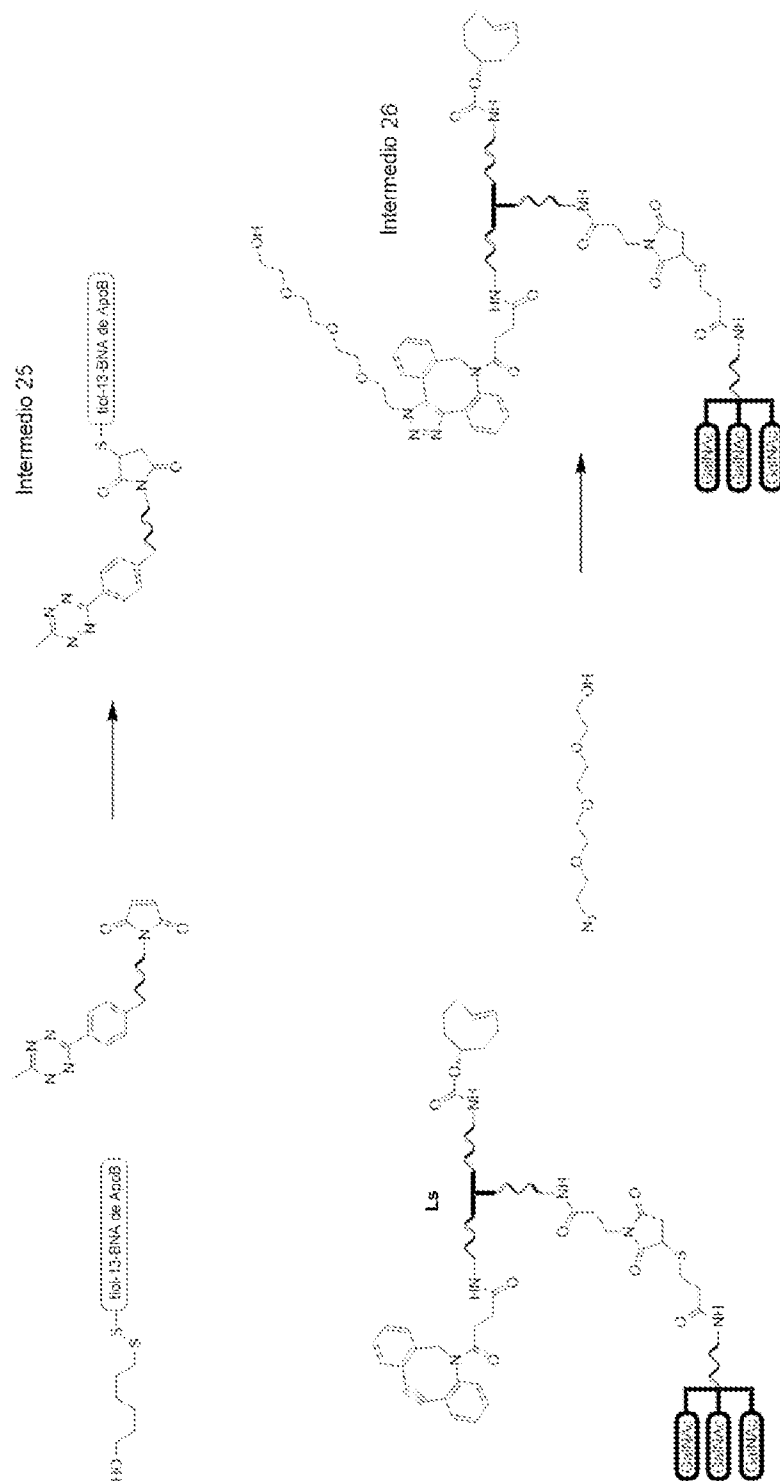


Fig. 28

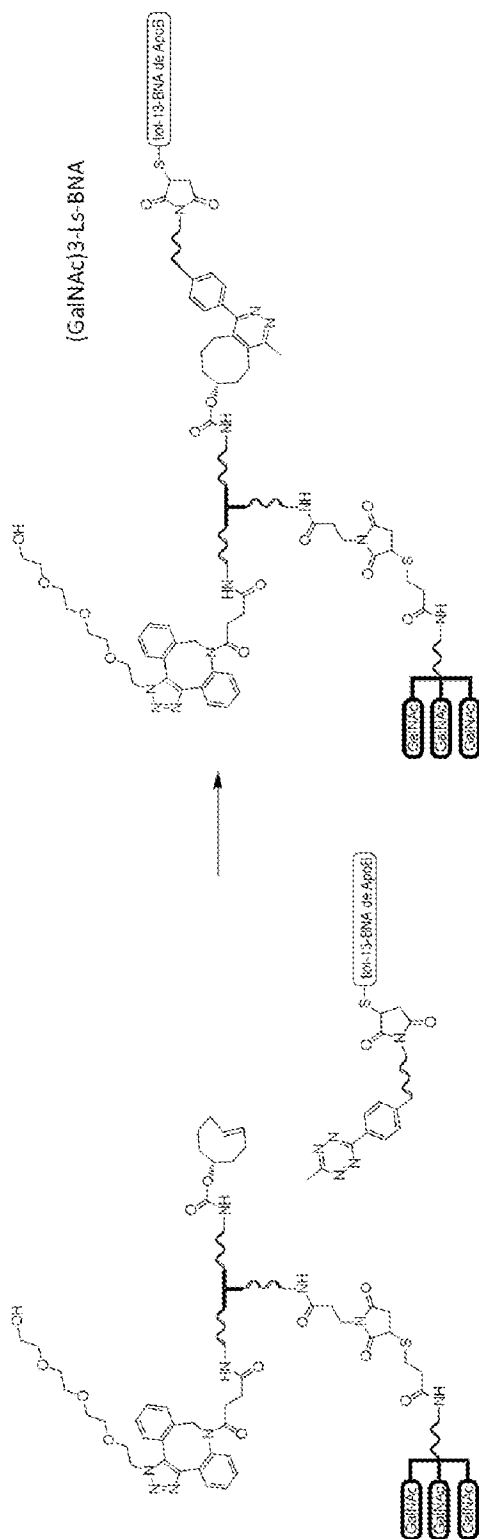


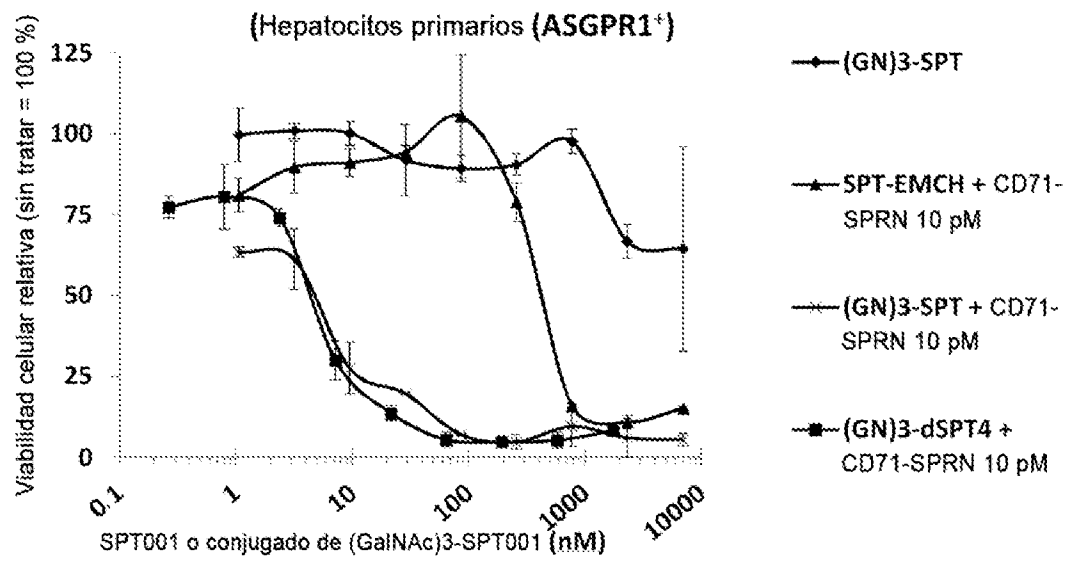
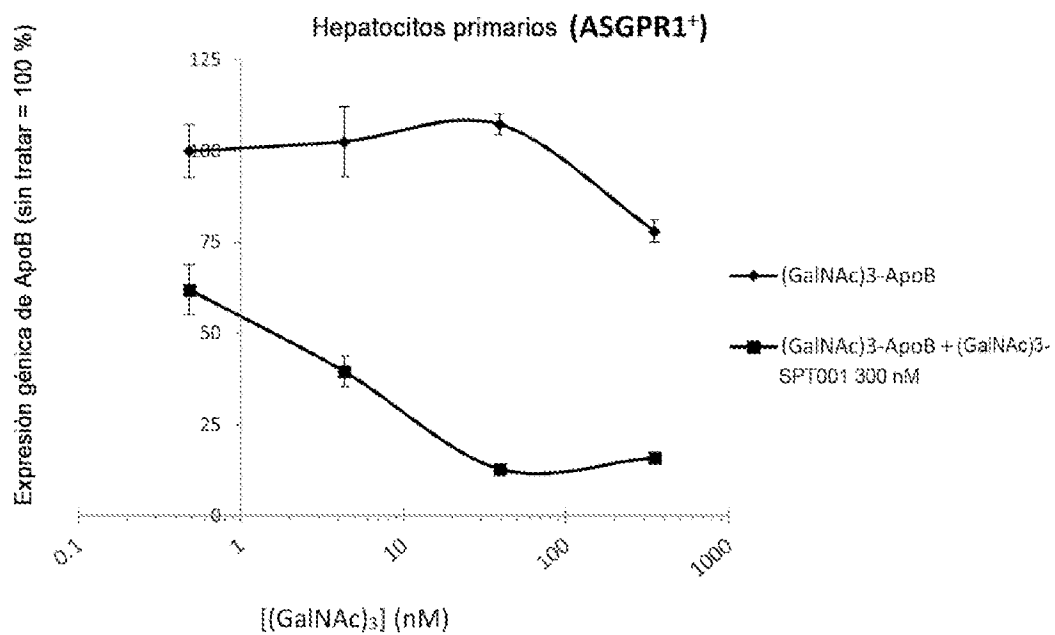
FIG. 29**A****B**

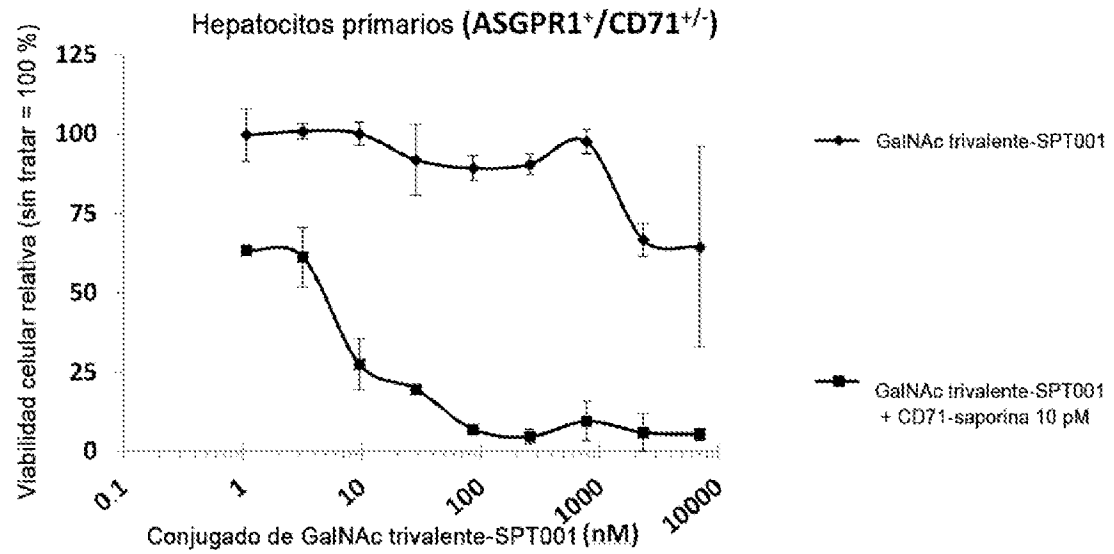
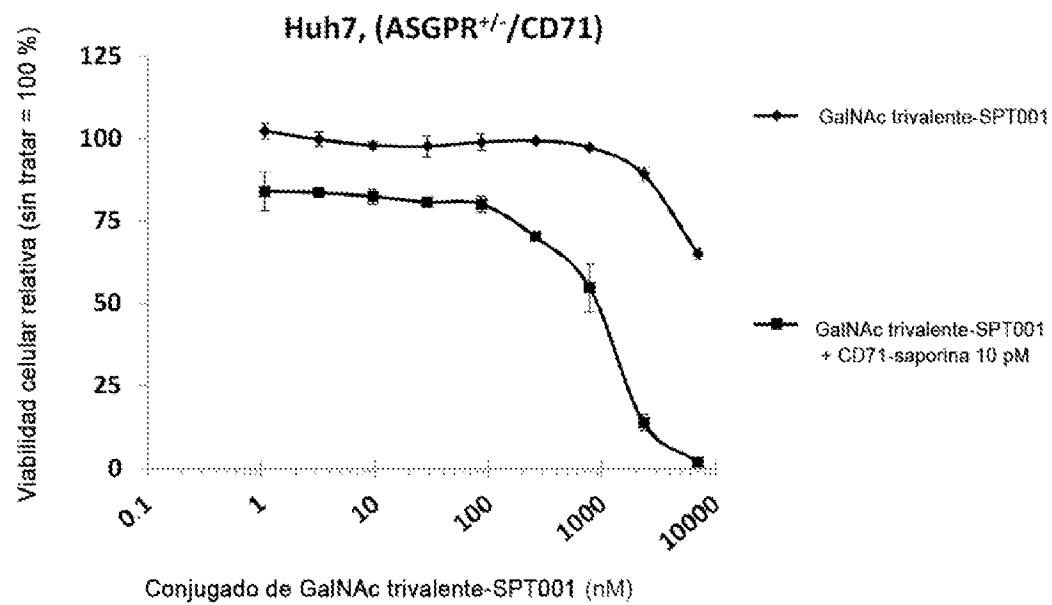
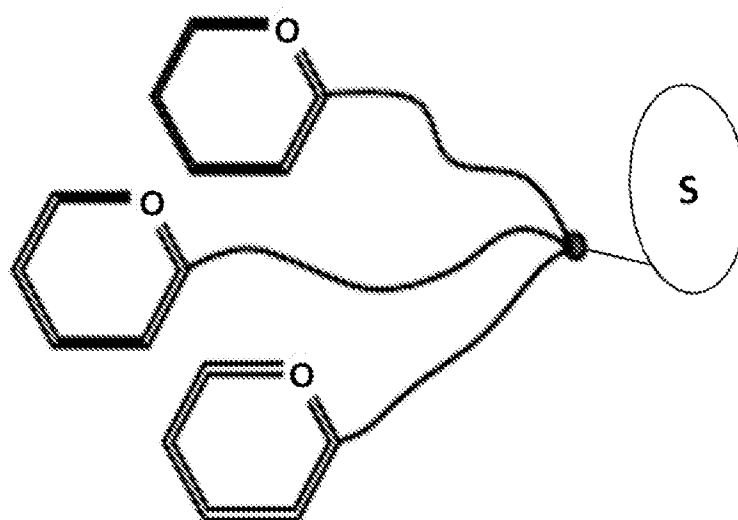
FIG. 30
A**B**

FIG. 30 **C**

Conjugado de GalNAc trivalente-SPT001



D

Conjugado de anticuerpo anti-CD71 – saporina

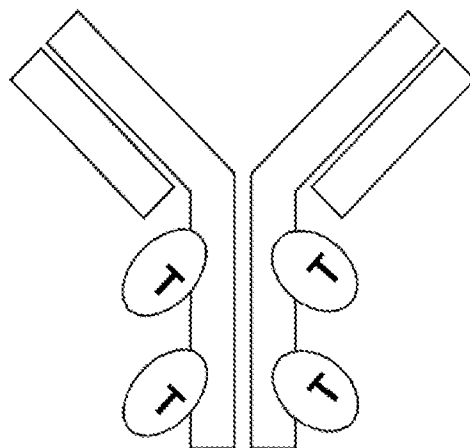


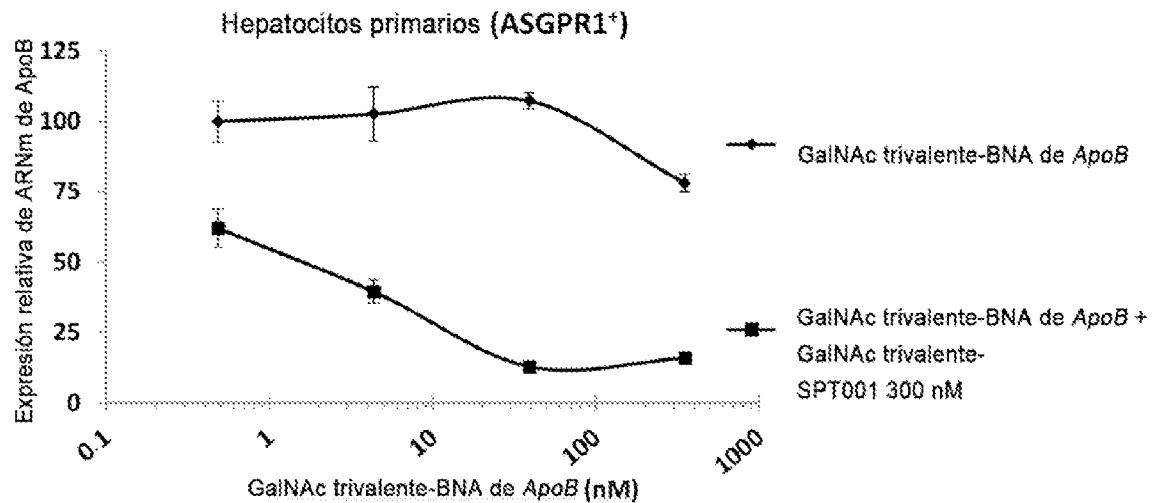
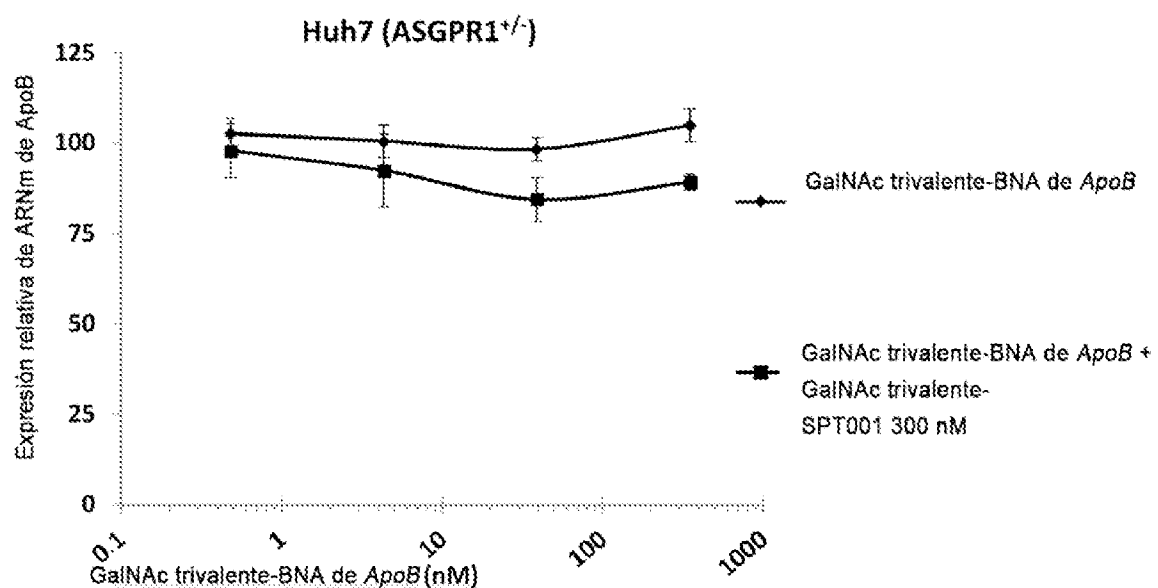
FIG. 31
A**B**

FIG. 31 C

Conjugado de GalNAc trivalente-BNA de ApoB

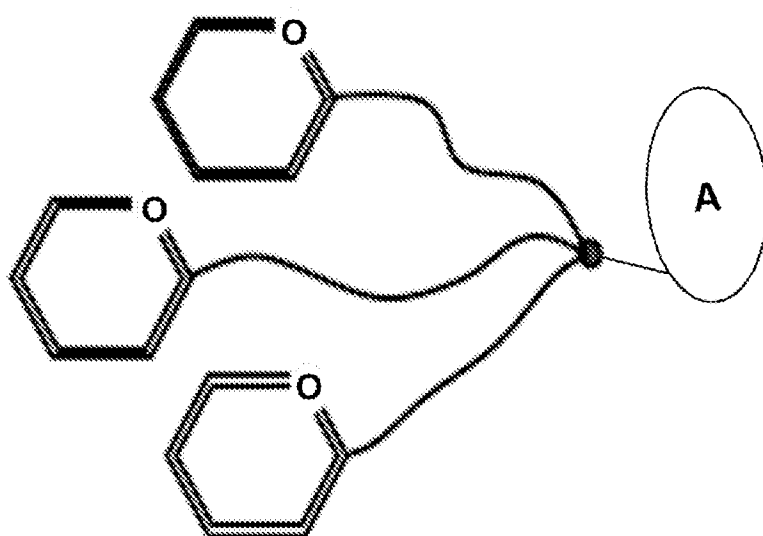


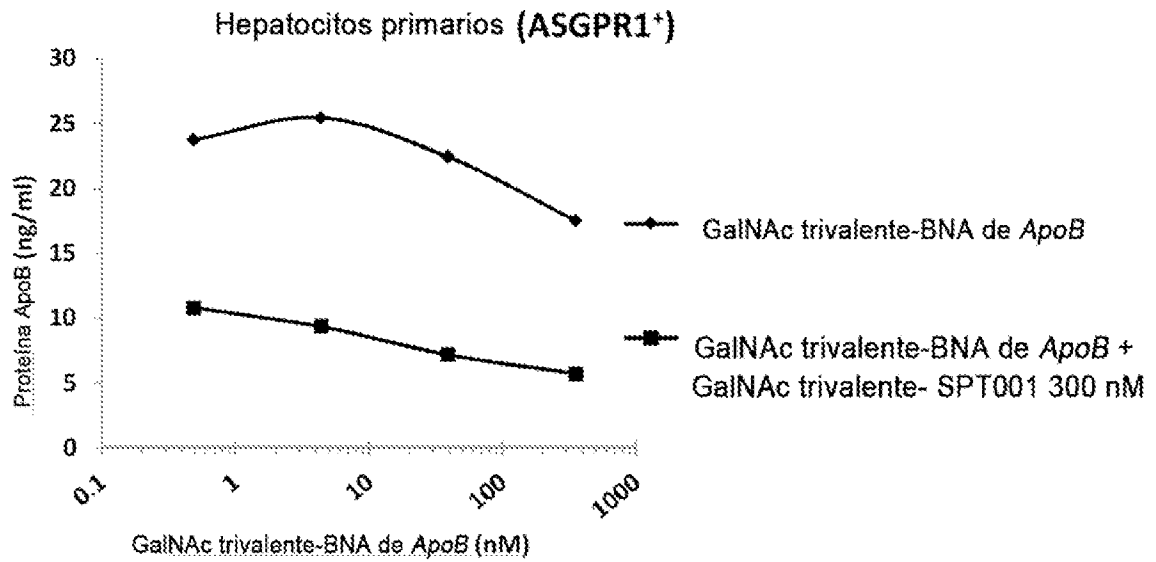
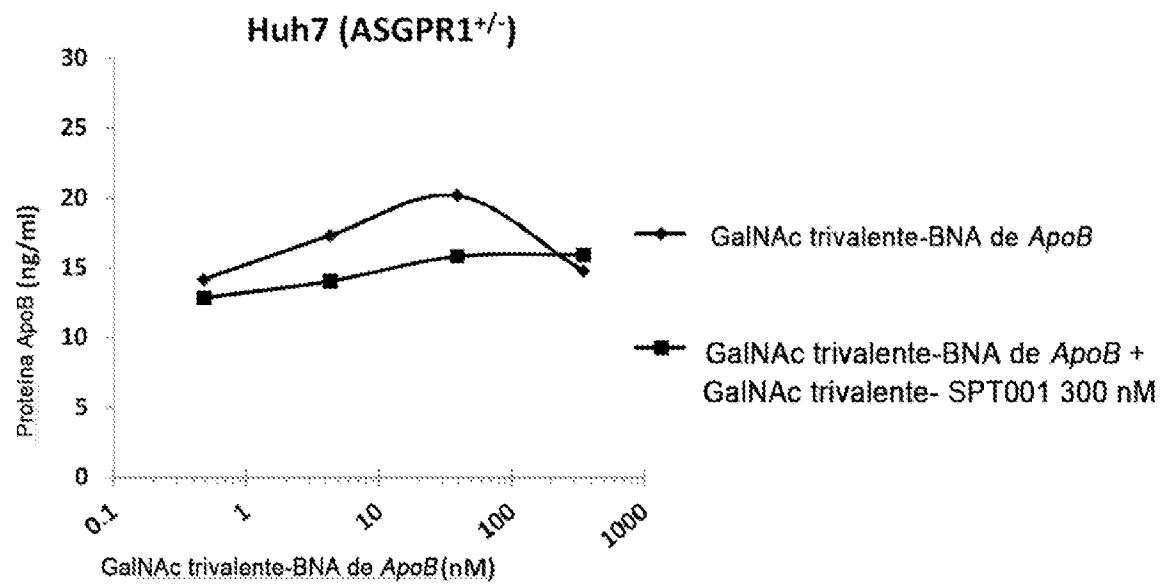
FIG. 32**A****B**

FIG. 33A

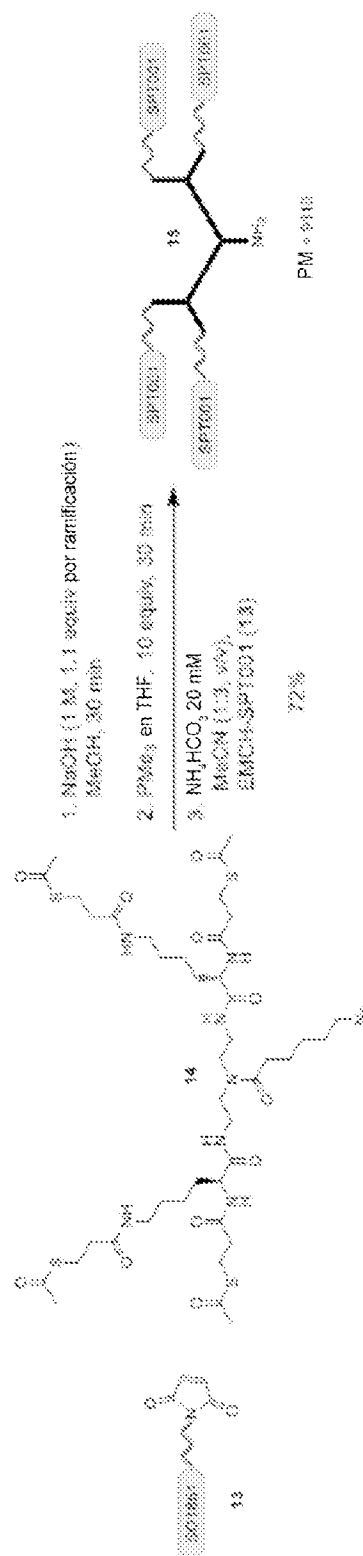


FIG. 33B

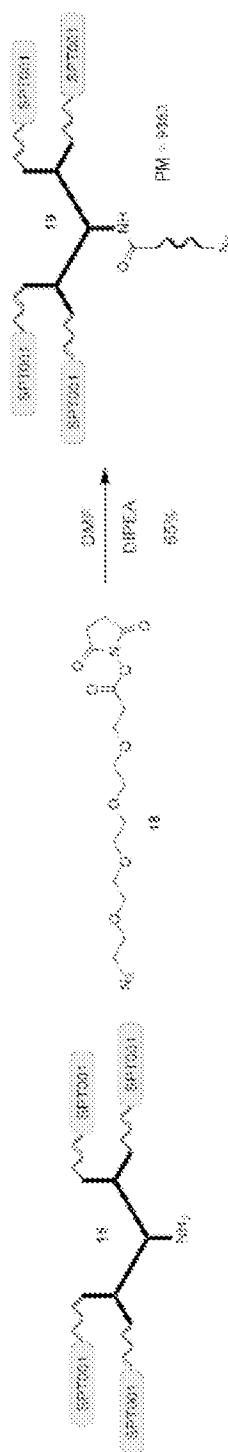


FIG. 33C

