

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 810 298**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/87** (2006.01)

**C08F 8/32** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.06.2014 PCT/EP2014/063756**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.12.2014 WO14207231**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.06.2014 E 14742474 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3013964**

54 Título: **Composiciones para introducir ARN en células**

30 Prioridad:

**28.06.2013 EP 13174390**

**22.08.2013 EP 13181380**

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

**08.03.2021**

73 Titular/es:

**ETHRIS GMBH (100.0%)**

**Semmelweisstrasse 3**

**82152 Planegg, DE**

72 Inventor/es:

**DOHMEN, CHRISTIAN;**

**PLANK, CHRISTIAN;**

**RUDOLPH, CARSTEN y**

**KOCH, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 810 298 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones para introducir ARN en células

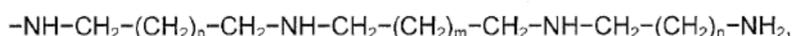
- 5 La presente invención se refiere a oligómeros, polímeros y lipídicos que comprenden fracciones oligo(aquilenamina) características que son útiles como vehículos para transfectar una célula con un ARN. La presente invención además se refiere a una composición que comprende al menos un ARN y un oligómero o polímero o un lipídico que comprende tales fracciones oligo(aquilenamina) y a un método de transfectar una célula usando dicha composición. Además, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, usos y un kit.
- 10 La viabilidad de las terapias de ácidos nucleicos depende en última instancia de la disponibilidad de métodos eficaces para administrar los ácidos nucleicos a las células.
- 15 En la administración de ácidos nucleicos en general, el uso de ácidos nucleicos desnudos es adecuado y suficiente en algunos casos para transfectar células (Wolff et al. 1990, *Science*, 247, 1465-1468). Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones prácticas previstas, es ventajoso o incluso necesario formular el ácido nucleico con al menos un segundo agente que proteja el ácido nucleico de degradación durante la administración y/o facilite la distribución a y en un tejido diana y/o facilite la absorción celular y permita el procesamiento intracelular adecuado. Tales formulaciones para la administración de ácidos nucleicos se denominan vectores en la bibliografía científica. Se han descrito previamente, una gran variedad de compuestos para la vectorización de ácidos nucleicos, los llamados reactivos de transfección. Estos compuestos son habitualmente o bien policationes o composiciones que comprenden lípidos catiónicos o compuestos de tipo lípido tal como lipídicos (documento US 8.450.298). Los complejos de ácidos nucleicos con policationes se denominan poliplejos, esos con lípidos catiónicos se denominan lipoplejos (Feigner et al. 1997, *Hum Gene Ther*, 8, 511-512). También se han descrito complejos que comprenden tanto un polication como lípidos (Li y Huang en "Nonviral Vectors for Gene Therapy", Academic Press 1999, Capítulo 13, 295-303). Los reactivos de transfección se usan para unir y compactar los ácidos nucleicos para producir complejos primarios en el intervalo de tamaño nanométrico. En medios que contienen sal estos complejos tienden a agregar, también conocido como agregación inducida por sal, lo que puede ser ventajoso para la transfección en cultivo celular o administración localizada in vivo (Ogris et al. 1998, *Gene Ther*, 5, 1425-1433; Ogris et al. 2001, *AAPS PharmSci*, 3, E21). La agregación se puede evitar y los complejos de ácidos nucleicos con reactivos de transfección se pueden estabilizar por protección de superficie con polímeros tal como poli(etilenglicol). La protección también se usa para evitar la opsonización de y la activación del complemento por complejos de ácidos nucleicos con reactivos de transfección (Finsinger et al. 2000, *Gene Ther*, 7, 1183-1192). La compactación de ácidos nucleicos por reactivos de transfección no solo los protege contra la degradación por nucleasas, sino que también los hace adecuados para la absorción celular por endocitosis. Numerosas policationes lineales y ramificadas son adecuados para unirse y compactar ácidos nucleicos incluyendo, pero no limitados a, poli(etilenoimina), dendrímeros de poli(amidoamina), poli(metacrilato de 2-(dimetilamino)etilo) (pDMAEMA) o derivados catiónicos de poli(N-(2-hidroxipropil)metacrilamida) (pHPMA), poli(beta-amino éster)es (Akinc et al. 2003, *Bioconj Chem* 14(5):979-88), poli(aminoácidos) o péptidos catiónicos naturales y sintéticos tal como poli(lisinas), histonas, proteínas HMG o hidratos de carbono catiónicos tal como quitosanos. Además de polímeros que contienen aminas primarias, secundarias y/o terciarias mencionadas anteriormente, las estructuras que contienen fracciones guanidilo son una clase importante de moléculas para el fin de formación de complejos de ácidos nucleicos y administración. Los polímeros modificados con guanidilo como estructuras basadas en arginina (Yamanouchi et al. 2008, *Biomaterials* 29(22):3269-77), PAMAM modificado con arginina (Son et al. 2013, *Bull. Korean Chem. Soc.* Vol 34 No. 3) o PEI guanidilado (Lee et al. 2008, *Bull. Korean Chem. Soc.* 2008, Vol. 29, No. 3) han subrayado la eficacia de tales sistemas. Especialmente en el caso de interacción de ARN, las características moleculares de la fracción guanidilo muestra propiedades de unión únicas (Calnan et al. 19991, *Science* 252(5009), 1167-1171). Para la generación de tales estructuras se pueden usar métodos como revisan Katritzky y Rogovoy (Katritzky & Rogovoy 2005, *ARKIVOC* (iv) 49-87). Con frecuencia, los poliplejos se modifican adicionalmente para contener una fracción que se dirige a células o de direccionamiento intracelular y/o un componente desestabilizador de membrana tal como un virus inactivado (Curiel et al. 1991, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 8850-8854), una cápside vírica o una proteína o péptido víricos (Fender et al. 1997, *Nat Biotechnol*, 15, 52-56, Zhang et al. 1999, *Gene Ther*, 6, 171-181) o un péptido sintético perturbador de membrana (Wagner et al. 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7934-7938, Plank et al. 1994, *J Biol Chem*, 269, 12918-12924).
- 55 Tras la absorción endocítica, los complejos son secuestrados en vesículas intracelulares tal como endosomas y lisosomas donde se exponen a la maquinaria de degradación celular. Por tanto, se ha reconocido que el escape de vesículas intracelulares es esencial para la administración eficaz de ácidos nucleicos funcionales, un requisito que también se aplica a infección vírica funcional (Wagner et al. 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 7934-7938, Plank et al. 1994, *J Biol Chem*, 269, 12918-12924). Los mecanismos que la naturaleza ha desarrollado para la infectividad vírica han sido mimetizados para lograr administración de ácidos nucleicos eficaz por vectores sintéticos. Para este fin, se han usado péptidos desestabilizadores de membrana anfífilos tal como los péptidos INF, GALA y KALA o melitina y derivados de melitina (Boeckle et al. 2006, *J Control Release*, 112, 240-248) con gran éxito para complementar reactivos de transfección policatiónicos con funcionalidad de escape endosómico (Plank et al. 1998, *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 21-35). En lipoplejos, tal funcionalidad es inherente por la capacidad de sus fracciones lipídicas a fusionarse con las membranas celulares (Xu y Szoka 1996, *Biochemistry*, 35, 5616-5623, Zelphati y Szoka 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 11493-11498). Desde el artículo central por Boussif y col. (Boussif et al. 1995, *Proc Natl*

Acad Sci USA, 92, 7297-7301) se sabe que la funcionalidad de escape endosómico de los poliplejos se puede realizar por medios fisicoquímicos. Cuando se usa poli(etiliminina) (PEI) como un polication para formar poliplejos, su capacidad tamponante a pH ácido es suficiente para desencadenar el escape endosómico. Se sabe que la luz de los endosomas se acidifica por una bomba de protones que reside en las membranas endosómicas (Lafourcade et al. 2008, PLoS One, 3, e2758). Esta acidificación es el desencadenante para el escape endosómico de algunos virus como la gripe o adenovirus. La llamada teoría de la esponja de protones, apoyada por evidencia experimental, describe la acción mecanicista potencial de polímeros que comprenden características estructurales químicas de PEI: Una fracción sustancial de los grupos amino de PEI están sin protonar a pH neutro (fisiológico) (Ziebarth y Wang 2010, Biomacromolecules, 11, 29-38). En virtud de los grupos amino protonados y por tanto cargados positivamente, los polímeros de tipo PEI se pueden unir a y compactar ácidos nucleicos. Las aminas no protonadas se pueden protonar a pH ácido, y por tanto tienen capacidad tamponante en los endosomas. La acidificación endosómica por la bomba de protones viene con acumulación de iones cloruro (Sonawane et al. 2003, J Biol Chem, 278, 44826-44831). En presencia de una molécula tamponante tal como PEI en la luz del endosoma, la bomba de protones transportará más protones a la luz del endosoma, junto con acumulación de cloruro, de lo que haría en su ausencia hasta que se alcanza el pH endosómico ácido natural. Se piensa que la acumulación desproporcionada de iones en los endosomas lleva a una desestabilización osmótica de las vesículas, lo que produce con el tiempo una ruptura de vesículas y la liberación del complejo de ácido nucleico al citoplasma.

En la base de la teoría de la esponja de protones, numerosos investigadores han recogido las características estructurales de PEI al crear bibliotecas de polímeros novedosas que comprenden aminas con capacidad tamponante a pH ácido. En los documentos US 7.780.957 y US 7.829.657 Kataoka y col. describen polímeros basados en un esqueleto de poli(ácido glutámico) o poli(ácido aspártico) donde las cadenas laterales de ácido carboxílico se derivan con cadenas laterales amino protonables a pH ácido. Sin embargo, el espacio estructural rico de oligo(alquilenaminas) que contienen unidades de alquilenamina alternantes, no idénticas para servir como fracciones potenciadoras de transfección en policationes no se ha explorado. En particular, no se ha investigado previamente para transfección de ARNm.

En contraste, mucho del trabajo científico de Kataoka y col. se ha enfocado en poli{N-[N'-(2-aminoetil)-2-aminoetil]aspartamida}. En una publicación por Uchida et al. (2011, J Am Chem Soc. 133, 15524-15532) el mismo grupo ha examinado una serie de poliaspartamidas N-sustituidas que poseen unidades de aminoetileno repetitivas en las cadenas laterales de la fórmula general  $-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH})_m-\text{H}$ . De forma interesante, cuando los autores examinaron la eficacia de la familia de polímeros en transfección de ADN de plásmido, se observó "un efecto distintivo par-impar de las unidades de aminoetileno repetitivas en la cadena lateral del polímero sobre las eficacias de escape endosómico y transfección a varias líneas celulares. Los poliplejos de los polímeros con un número par de unidades de aminoetileno repetitivas (PA-E) lograron eficacia de transfección un orden de magnitud mayor, sin citotoxicidad marcada, que esos de los polímeros con un número impar de unidades repetitivas de aminoetileno (PA-O). Este efecto par-impar estaba de acuerdo bien con la capacidad tamponante de estos polímeros, así como su capacidad de alterar la integridad de la membrana selectivamente a pH endosómico, lo que lleva a escape endosómico muy eficaz de los poliplejos de PA-E. Además, la formación de una matriz cargada polivalente con espaciamiento preciso entre grupos amino protonados en la cadena lateral del polímero se mostró que era esencial para la alteración eficaz de la membrana endosómica, facilitando de esta manera el transporte del poliplejo al citoplasma" (Resumen de Uchida et al. 2011, J Am Chem Soc. 133, 15524-15532). De forma interesante, cuando el mismo grupo de investigadores comparó derivados de poli(aspartamida) que portan cadenas laterales de 1,2-diaminoetano, [PAsp(DET)] frente a análogos que portan cadenas laterales de 1,3-diaminopropano, [PAsp(DTP)], observaron que los poliplejos de PAsp(DTP) mostraron una caída significativa en la eficacia de transfección de ADN de plásmido a altas proporciones N/P debido a la citotoxicidad progresivamente aumentada con la proporción N/P, incluso aunque las diferencias fisicoquímicas respecto a [PAsp(DET)] en tamaño de partícula y potencial  $\zeta$  eran despreciables (Miyata et al. 2008 J Am Chem Soc. 130, 16287-16294). Por tanto, basado en la regla par-impar se esperaría que los polímeros que comprenden 3 grupos amino protonables y grupos separadores propileno serían inferiores a PAsp(DET) y que cadenas laterales que comprenden 1,3-diaminopropano están asociadas con problemas de toxicidad. No se sabe nada sobre las relaciones estructural-actividad de tales polímeros para transfección de ARNm.

Geall y colaboradores han descrito carbamatos de colesterol-poliamina con la fracción poliamina que tiene la fórmula general



donde  $m = 0, 1$  o  $2$  y donde  $n = 0$  o  $1$  (Geall et al. 1999, FEBS Lett, 459, 337-342). Han examinado los valores de  $\text{pK}_a$  de estas sustancias y sus características en condensación de ADN de timo de ternera. Encontraron que la distribución regioquímica de cargas positivas a lo largo de los carbamatos de colesterol poliamina desempeña papeles significativos en modular la afinidad de unión al ADN y eficacia de lipofección. Encontraron que entre los carbamatos de colesterol-poliamina examinados, espermina que constituye la fracción poliamina,  $-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  (propil/butil/propil) dio con mucho la mayor expresión de gen indicador tras la transfección de ADN de plásmido que codifica beta galactosidasa en cultivo celular, mientras que, por ejemplo,  $-\text{HN}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$  (etil/propil/etil) era de tres a diez veces menos eficaz. Por tanto, en vista

de las enseñanzas de Kataoka y col. (regla par-impar) y los hallazgos de Geall y col. el experto en la materia descartaría la última estructura en el contexto de administración de ácidos nucleicos.

5 Wang y col. han descrito poli(metacrilato de metilo)-injerto-oligoaminas como reactivos de transfección eficaces y poco citotóxicos para ADN de plásmido (Wang et al. 2010, Molecular BioSystems, 6, 256-263). Estos polímeros se obtuvieron por aminólisis de poli(metacrilato de metilo) con oligoaminas de la fórmula general  $H_2N-CH_2-CH_2-(NH-CH_2-CH_2)_m-NH_2$ , donde  $m = 1, 2$  o  $3$ . Los autores encontraron que la eficacia de transfección aumentaba con una longitud creciente de aminas.

10 Ou y col. han descrito poli(disulfuro amido aminas) que derivan de oligoaminas protegidas terminalmente que tienen la estructura  $Dde-NH-(CH_2)_a-NH-(CH_2)_b-NH-(CH_2)_a-NH-Dde$  por copolimerización con  $N,N'$ -cistaminabisacrilamida (Ou et al. 2009, Biomaterials 30, 58045814; documento WO 2010/065660). Examinaron las combinaciones  $a = 2$  y  $b = 2$ ,  $a = 2$  y  $b = 3$ ,  $a = 3$  y  $b = 2$ ,  $a = 3$  y  $b = 3$ ,  $a = 3$  y  $b = 4$  (espermina). Dde es el grupo protector 2-acetilmedona. Después de la eliminación del grupo protector, la síntesis da poli(disulfuro amido aminas) donde las aminas internas, originalmente secundarias se vuelven aminas terciarias como parte de la cadena principal de polímero y las aminas terminales se vuelven parte de cadenas laterales colgantes etilen o propilenamina. Tales polímeros tienen capacidad tamponante en el intervalo de pH relevante para la administración de ácidos nucleicos y son útiles para transfectar ADN de plásmido en células.

20 Recientemente, se ha descubierto la utilidad de una nueva clase de estructuras sintéticas similares a lípidos, pero no lipídicas, llamadas lipidoides, para la administración de ácidos nucleicos in vitro e in vivo (documento US 8.450.298; Love et al. 2010, PNAS 107, 1864-1869; documento WO2006/138380; Akinc et al. 2008, Nat Biotechnol 26, 561-569). Los lipidoides se obtienen al hacer reaccionar compuestos que contienen amina con epóxidos alifáticos, acrilatos, acrilamidas o aldehídos. Los autores/inventores han proporcionado procedimientos sintéticos para obtener bibliotecas de lipidoides y procedimientos de cribado para seleccionar compuestos útiles con utilidad en la administración de ácidos nucleicos a células in vitro.

30 Como es evidente de lo anterior, se ha hecho mucho trabajo de investigación y desarrollo en el pasado en la administración de otras moléculas de ácido nucleico, tal como ADN de plásmido, oligonucleótidos, ARNip o análogos de ácidos nucleicos. La administración de ARNm no se ha investigado en mucha profundidad. Algunos autores han alegado que compuestos y formulaciones que funcionan bien para la administración de ADN o ARNip funcionarían similarmente para la administración de ARNm. Sin embargo, en contraste con ADN de plásmido o ARNip, el ARNm es una molécula monocatenaria. Por tanto, en base solo a consideraciones estructurales se esperarían requisitos diferentes para compuestos y formulaciones para la administración de ARNm frente a la administración de ADN o ARNip.

40 La bibliografía previa citada anteriormente describe la administración de ácidos nucleico bicatenarios tal como ADN de plásmido o ARNip a células, pero no se sabe si los métodos y compuestos descritos son capaces de administrar ácidos nucleicos monocatenarios tal como ARNm a células. Notablemente, se ha observado previamente que la transfección de ARNm se diferencia sustancialmente de la transfección de ADN de plásmido en células (Bettinger et al. 2001, Nucleic Acids Res, 29,3882-91, Uzgün et al, 2011, Pharm Res, 28, 2223-32).

45 En línea con esto, los presentes inventores encontraron que, cuando cribaron más de 100 miembros de una familia de polímeros divulgada en el documento WO 2011/154331 para su idoneidad en la administración de ARN, preferiblemente la administración de ARN monocatenario tal como ARNm, a células, ninguno de los compuestos era útil para transfectar ARNm de una manera que diera lugar a la expresión de un gen codificado por el ARNm. En contraste, todos estos compuestos son eficaces en la administración de ADN de plásmido y/o ARNip. Por tanto, las reglas establecidas para la administración de ácidos nucleicos bicatenarios a células no se aplican a priori para ARNm monocatenario. La divulgación de WO 2011/154331 comprende oligómeros químicamente definidos que son 2-60 unidades de unidades oligo(alquilenamino)ácidos que corresponden a la fórmula general  $HOOC-Z-R-NH-[(CH_2)_b-NH]_a-H$ , donde Z es una serie de metileno o una variedad de otros grupos, R es un residuo de metileno o carboxi y a y b son independientemente números enteros de 1-7 o 2-7, respectivamente. Los oligómeros de esta familia comprenden grupos amino protonables capaces de ejercer un llamado efecto esponja de protones y se ha mostrado que son muy activos en la transfección de ADN de plásmido y ARNip in vitro e in vivo. De forma importante, el documento WO 55 2011/154331 y publicaciones científicas asociadas enseñan en gran detalle cómo se pueden establecer bibliotecas de oligómeros/polímeros de secuencia definida a partir de elementos básicos correspondientes a la fórmula general  $HOOC-Z-R-NH-[(CH_2)_b-NH]_a-H$ .

60 La tarea técnica subyacente a la presente invención, por tanto, era proporcionar una composición que sea adecuada para la administración de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, con una alta eficacia en una célula o a un tejido.

### Compendio de la invención

65 La invención es como se define en las reivindicaciones.

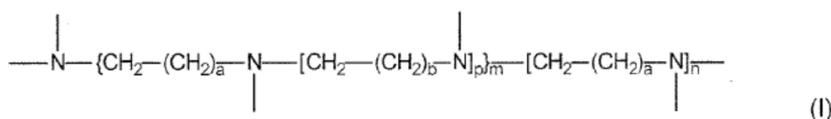
Esta tarea se ha logrado mediante la provisión de las formas de realización como se caracterizan en las reivindicaciones y se ilustran en más detalle en la siguiente descripción general y los ejemplos. En particular, la invención proporciona, en sus varias formas de realización como se definen adicionalmente en el presente documento:

- 5 - composiciones que comprenden oligómeros, polímeros o lipídeos que comprenden oligo(alquilenaminas) que contienen unidades de alquilenamina alternantes, no idénticas como se define en las reivindicaciones en combinación con un ARN monocatenario y en particular un ARNm que son útiles para administrar el ARN monocatenario tal como ARNm, en una célula o a un tejido,
- métodos para preparar dichas composiciones, así como
- 10 - métodos que usan dichas composiciones para administrar un ARN monocatenario tal como ARNm, en una célula, así como usos médicos y métodos terapéuticos que explotan la capacidad de las composiciones según la invención para administrar un ARN monocatenario tal como ARNm.

15 El espacio estructural rico de oligo(alquilenaminas) que contienen unidades de alquilenamina alternantes, no idénticas en compuestos oligoméricos o poliméricos, incluyendo compuestos lineales, ramificados y dendríticos, aleatorios o de secuencia definida, o en compuesto lipídeos comprendidos en una composición útil para administrar un ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula no se ha explorado. Ni el espacio de secuencia de tales compuestos como tal ha sido explorado.

20 Se encontró sorprendentemente como un principio general previamente desconocido para oligómeros, polímeros, y lipídeos que una organización de unidades de alquilenaminas de longitud alternante en grupos de tres o más unidades y que contiene una unidad de etilenamina en composiciones para transfectar una célula con un ARN monocatenario tal como ARNm, era consistentemente más eficaz que organizaciones análogas de unidades de alquilenaminas de longitud no alternante. Por tanto, se proporcionaron oligómeros, polímeros o lipídeos que

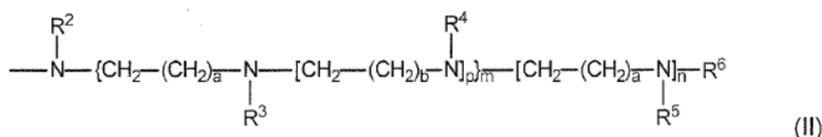
25 comparten una entidad estructural común que se ilustra en la fórmula (I):



y que se explicarán más adelante.

30 En particular, la invención proporciona, en un primer aspecto, una composición que comprende un ARN monocatenario tal como ARNm, y un componente que comprende una oligo(alquilenamina) componente que se selecciona de:

- 35 a) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal:

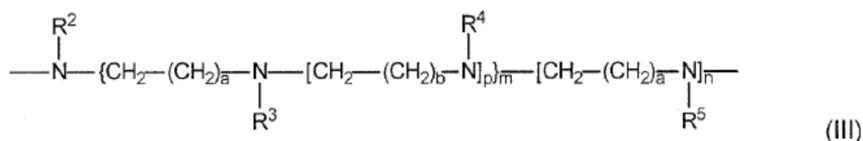


40 en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (II) en una pluralidad de tales grupos:

- a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,
- p es 1 o 2,
- m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y
- 45 R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; y una cadena de poli(etilenglicol);
- R<sup>6</sup> se selecciona de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor,
- 50

y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II);

- 55 b) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas:



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (III) en una pluralidad de tales grupos:

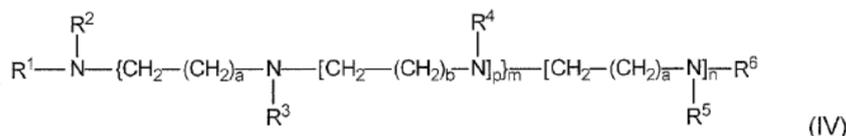
a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,  
p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; y una cadena de poli(etilenglicol);

y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III); y

c) un lipidoide que tiene la estructura de fórmula (IV):



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,  
p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor; siempre que al menos dos residuos entre R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> sean un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C;

y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IV) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (IV).

En aspectos adicionales, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden las composiciones según la invención. La divulgación también abarca métodos para la preparación de los oligómeros, polímeros o lipidoidees según la divulgación, así como las composiciones y composiciones farmacéuticas según la invención.

Aspectos aun adicionales se dirigen al uso de una composición según la invención para administrar un ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula diana o a tejido in vitro, y a un método in vitro para administrar ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula que comprende la etapa de poner una composición según la invención en contacto con la célula.

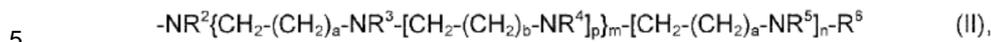
#### Descripción detallada de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones.

##### Grupos oligo(alquilenamina)

Las estructuras oligo(alquilenamina) de las fórmulas (I), (III) y (IV) se caracterizan en que combinan unidades de etilenamina más cortas (también denominadas para ilustración "S") (es decir, a o b es 1) con unidades de alquilenamina más largas (también denominadas para ilustración "L") (es decir, el otro de a o b un número entero de 2 a 4) de una manera alternante. Inesperadamente, se ha encontrado que esta organización de las unidades protonables proporciona ventajas en términos de idoneidad del grupo resultante para proporcionar un vehículo para administrar ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula.

Como se ha señalado anteriormente, los oligómeros o polímeros que se pueden usar en las composiciones según una forma de realización preferida de la invención comprenden una pluralidad de grupos oligo(alquilenamina) de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal:



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (II) en una pluralidad de tales grupos:

10 a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,  
p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

15 R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; y una cadena de poli(etilenglicol);

20 R<sup>6</sup> se selecciona de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor.

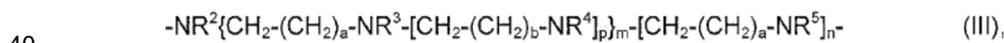
25 Preferiblemente, R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> son hidrógeno y R<sup>6</sup> se selecciona de hidrógeno, un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; y una cadena de poli(etilenglicol). Más preferiblemente, R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> son hidrógeno. Preferiblemente, R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C8-C18 o alqueno de C8-C18 que tiene un doble enlace C-C, y más preferiblemente de alquilo de C8-C12 o alqueno de C8-C12 que tiene un doble enlace C-C y lo más preferiblemente de alquilo de C10-C12 o alqueno de C10-C12 que tiene un doble enlace C-C.

Uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) o sus formas de realización preferidas pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II).

30 Una pluralidad de grupos de fórmula (II) significa que dos o más de los grupos de fórmula (II) o sus formas de realización preferidas están contenidos en los oligómeros o polímeros según la divulgación, preferiblemente tres o más. En los polímeros que contienen una pluralidad de grupos de fórmula (II), se prefiere que 10 o más grupos de fórmula (II) estén presentes. Se entenderá que los grupos de fórmula (II) o sus formas de realización preferidas pueden tener la misma estructura dentro de un polímero u oligómero, o pueden tener dos o más estructuras diferentes en el

35 ámbito de la fórmula (II).

Según otra forma de realización preferida, los oligómeros o polímeros que se pueden usar en las composiciones según la invención comprenden una pluralidad de grupos oligo(alquilenamina) de fórmula (III) como unidades repetitivas:



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (III) en una pluralidad de tales grupos:

45 a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,  
p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

50 R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); un efector de escape endosómico y un ligando de receptor. Preferiblemente, R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> son hidrógeno. Preferiblemente, R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C8-C18 o alqueno de C8-C18 que tiene un doble enlace C-C, y más preferiblemente de alquilo de C8-C12 o alqueno de C8-C12 que tiene un doble enlace C-C y lo más preferiblemente de alquilo de C10-C12 o alqueno de C10-C12 que tiene un doble enlace C-C.

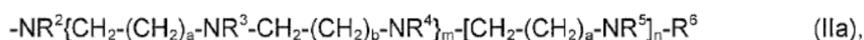
55 Uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) o sus formas de realización preferidas pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III).

60 Opcionalmente, los oligómeros o polímeros que comprenden una pluralidad de grupos de fórmula (III) o sus formas de realización preferidas como unidades repetitivas pueden comprender, además, uno o más grupo(s) oligo(alquilenamina) de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal.

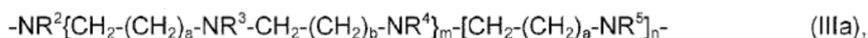
Una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas significa que dos o más de los grupos de fórmula (III) o sus formas de realización preferidas están contenidos en los oligómeros o polímeros según la divulgación,

preferiblemente tres o más. En general, sustancias que comprenden de 2 a 9 unidades repetitivas se denominan en el presente documento oligómeros, las que comprenden 10 o más unidades repetitivas polímeros. Por tanto, en los polímeros que comprenden una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas, 10 o más grupos de fórmula (III) están preferiblemente presentes. Se entenderá que los grupos de fórmula (III) o sus formas de realización preferidas pueden tener la misma estructura dentro de un polímero u oligómero, o puedan tener dos o más estructuras diferentes en el ámbito de la fórmula (III). Ventajosamente, y según una forma de realización preferida, los oligómeros o polímeros que contienen una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas se pueden proporcionar en forma de una biblioteca de polímeros de secuencia definida que se preparan de diferentes grupos de fórmula (III) en una polimerización controlada, por etapas.

En línea con las fórmulas (II) y (III) anteriores, la unidad de alquilenamina se puede repetir una vez en una cadena alternante de modo que se pueden producir fracciones de oligo(alquilenamina) de tipo -S-L-L-S- o -L-S-S-L-, en donde S representa una unidad de etilenamina más corta, y L representa un unidad de alquilenamina más larga. Sin embargo, los grupos preferidos de fórmula (II) y (III) son esos en donde no se produce repetición, es decir, en donde p es 1, de modo que las unidades más cortas o más largas no aparecen en pares. En otras palabras, el grupo de fórmula (II) es preferiblemente un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIa) y el grupo de fórmula (III) es preferiblemente in grupo de oligo(alquilenamina) de (IIIa):



en donde a, b, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la fórmula (II), incluyendo formas de realización preferidas, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIa) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónica;

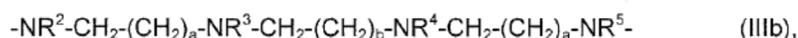


en donde a, b, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como en la fórmula (III), incluyendo formas de realización preferidas, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIIa) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónica.

Además, en general se prefiere para el grupo oligo(alquilenamina) de las fórmulas (II) y (III) que n sea 1, y más preferido que m sea 1 y n sea 1. Por tanto, es particularmente preferido que el grupo de fórmula (II) sea un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIb), y que el grupo de fórmula (III) sea un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIIb):

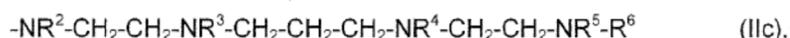


en donde a, b, y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la fórmula (II), incluyendo formas de realización preferidas, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIb) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónica;

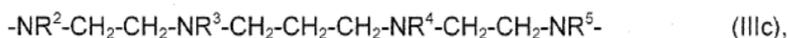


en donde a, b, y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como en la fórmula (III), incluyendo formas de realización preferidas, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIIb) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónica

Con respecto a la longitud de las unidades de alquilenamina en los grupos de oligo(alquilenamina) de fórmula (II), (IIa), (IIb) y (III), (IIIa), (IIIb), se entenderá que una de las unidades alternantes necesita ser una unidad de etilenamina (es decir, o bien a o b debe ser 1). La otra unidad alternante puede ser una unidad de propilenamina, una unidad de butilenamina o una unidad de pentilenamina (es decir, el otro de a o b es un número entero de 2 a 4. Preferiblemente, el otro de a o b es 2 o 3, y lo más preferiblemente a es 1 y b es 2, o a es 2 y b es 1. Por tanto, incluso más preferido como grupo (II) es un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIc), e incluso más preferido como un grupo (III) es un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIIc):



en donde R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la fórmula (II), y formas de realización preferidas de la misma, y son más preferiblemente hidrógeno, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIc) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónica;



en donde  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^5$  se definen como en la fórmula (III) y formas de realización preferidas de la misma, y son más preferiblemente hidrógeno, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIIc) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónica.

En cuanto a que cualquiera de los grupos  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^6$  en las fórmulas (II), (IIa), (IIb) y (IIc) o los grupos  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^5$  en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb) y (IIIc) sean un grupo protector para un grupo amino tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/138380, las formas de realización preferidas de los mismo son t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), o carbobenciloxi (Cbz).

En cuanto a que cualquiera de los grupos  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^6$  en las fórmulas (II), (IIa), (IIb) y (IIc) o los grupos  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^5$  en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb) y (IIIc) sean un ligando de receptor, se dan ejemplos útiles en Philipp y Wagner en "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3ª Edición, Capítulo 15, CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009. Los ligandos de receptor preferidos para tejido pulmonar se describen en Pfeifer et al. 2010, Ther. Deliv. 1(1)1 33-48. Los ligandos de receptor preferidos incluyen péptidos cíclicos o lineales sintéticos tal como los derivados de cribado de bibliotecas de péptidos para unión a una estructura de superficie celular particular o tipo celular particular, péptidos RGD cíclicos o lineales, hidratos de carbono sintéticos o naturales tal como ácido siálico, galactosa o manosa o ligandos sintéticos derivados de hacer reaccionar un hidrato de carbono, por ejemplo, con un péptido, anticuerpos que reconocen específicamente estructuras de superficie celular, ácido fólico, factor de crecimiento epidérmico y péptidos derivados del mismo, transferrina, anticuerpos anti-receptor de transferrina, nanocuerpos y fragmentos de anticuerpos, fármacos aprobados que se unen a moléculas de superficie celular conocidas, etc.

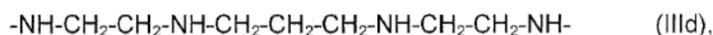
En cuanto a que cualquiera de los grupos  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^6$  en las fórmulas (II), (IIa), (IIb) y (IIc) o los grupos  $\text{R}^2$  a  $\text{R}^5$  en las fórmulas (III), (IIIa), (IIIb) y (IIIc) sean una cadena de poli(etilenglicol), el peso molecular preferido de la cadena de poli(etilenglicol) es 100-20.000 g/mol, más preferiblemente 1.000-10.000 g/mol y lo más preferiblemente es 1.000-5.000 g/mol.

Lo más preferido como grupo (II) es un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIId):



en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIId) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de polímero o dendrímero catiónica.

Lo más preferido como grupo (III) es un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (IIIId):



en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIIId) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de polímero o dendrímero catiónica.

Como se ha señalado anteriormente, los lipoides que se pueden usar en las composiciones según una forma de realización preferida de la invención tienen la estructura de fórmula (IV):



en donde las variables a, b, p, m, n y  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^6$  se definen como sigue:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y  $m + n$  es  $\geq 2$ ; y

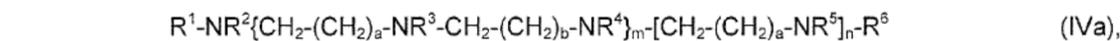
$\text{R}^1$  a  $\text{R}^6$  se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$  o  $-\text{CH}_2-\text{R}^7$  en donde  $\text{R}^7$  se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino;  $-\text{C}(\text{NH})-\text{NH}_2$ ; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor; siempre que al menos dos residuos entre  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^6$  sean un grupo  $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-\text{R}^7$ ,  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{C}=\text{O})-\text{NH}-\text{R}^7$  o  $-\text{CH}_2-\text{R}^7$  en donde  $\text{R}^7$  se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C.

Preferiblemente,  $\text{R}^1$  a  $\text{R}^6$  se seleccionan independientemente de hidrógeno; un grupo  $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{OH})\text{H}-\text{R}^7$  o  $-\text{CH}(\text{R}^7)-\text{CH}_2-\text{OH}$ , en donde  $\text{R}^7$  se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; y una cadena de poli(etilenglicol); siempre que al menos dos residuos entre  $\text{R}^1$

5 a R<sup>6</sup> sean un grupo -CH<sub>2</sub>-C(OH)H-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C. Más preferiblemente, R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno; y un grupo -CH<sub>2</sub>-C(OH)H-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C16 o alqueno de C3-C16 que tiene un doble enlace C-C; siempre que al menos dos residuos entre R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> sean un grupo  
 10 -CH<sub>2</sub>-C(OH)H-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C. Incluso más preferida es la constelación de que R<sup>1</sup> y R<sup>6</sup> se seleccionan independientemente de hidrógeno; y un grupo -CH<sub>2</sub>-C(OH)H-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; y que R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> son todos un grupo -CH<sub>2</sub>-C(OH)H-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C.  
 15 Preferiblemente R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C8-C16 o alqueno de C8-C18 que tiene un doble enlace C-C, y más preferiblemente de alquilo de C8-C12 o alqueno de C8-C12 que tiene un doble enlace C-C y lo más preferiblemente de alquilo de C10-C12 o alqueno de C10-C12 que tiene un doble enlace C-C.

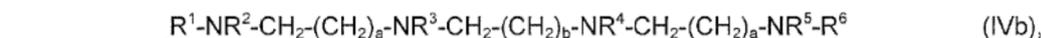
15 Uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IV) pueden estar protonados para proporcionar un lipidoide catiónico de fórmula (IV).

20 En línea con la fórmula (IV) anterior, una unidad alquilenamina se puede repetir una vez en una cadena alternante de modo que se pueden producir fracciones oligo(alquilenamina) del tipo -S-L-L-S- o -L-S-S-L-, en donde S representa una unidad de etilenamina más corta, y L representa una unidad de alquilenamina más larga. Sin embargo, un lipidoide preferido de fórmula (IV) es uno en donde no se produce repetición, es decir, en donde p es 1, de modo que las unidades más cortas o más largas no aparecen en pares. En otras palabras, el lipidoide de fórmula (IV) es preferiblemente un lipidoide de (IVa):



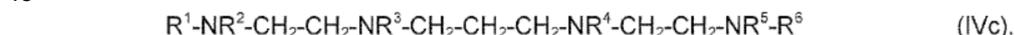
25 en donde a, b, m, n, y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la fórmula (IV), incluyendo formas de realización preferidas, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IVa) pueden estar protonados para proporcionar un lipidoide catiónico;

30 Además, en general se prefiere para el lipidoide de fórmula (IV) que n sea 1, y más preferido que m sea 1 y n sea 1. Por tanto, es particularmente preferido que el lipidoide de fórmula (IV) sea un lipidoide de fórmula (IVb):



35 en donde a, b, y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la fórmula (IV), incluyendo formas de realización preferidas, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IVb) pueden estar protonados para proporcionar un lipidoide catiónico.

40 Con respecto a la longitud de las unidades alquilenamina en el lipidoide de fórmula (IV), (IVa) y (IVb), se entenderá que una de las unidades alternantes necesita ser una unidad de etilenamina (es decir, o bien a o b debe ser 1). La otra unidad alternante puede ser una unidad de propilenamina, una unidad de butilenamina o una unidad pentilenamina (es decir, el otro de a o b es un número entero de 2 a 4. Preferiblemente, el otro de a o b es 2 o 3, y lo más preferiblemente a es 1 y b es 2, o a es 2 y b es 2. Por tanto, incluso más preferido como lipidoide de fórmula (IV) es un lipidoide de fórmula (IVc):



50 en donde R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la fórmula (IV) y formas de realización preferidas de la misma, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IVc) pueden estar protonados para proporcionar un lipidoide catiónico.

55 En cuanto a que cualquiera de los grupos R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> en las fórmulas (IV), (IVa), (IVb) y (IVc) sean un grupo protector para un grupo amino tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/138380, las formas de realización preferidas del mismo son t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), o carbobenciloxi (Cbz).

60 En cuanto a que cualquiera de los grupos R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> en las fórmulas (IV), (IVa), (IVb) y (IVc) sean un ligando de receptor, se dan ejemplos útiles en Philipp y Wagner en "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3ª Edición, Capítulo 15, CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009. Los ligandos de receptor preferidos para tejido pulmonar se describen en Pfeifer et al. 2010, Ther. Deliv. 1(1)1 33-48. Los ligandos de receptor preferidos incluyen péptidos cíclicos o lineales sintéticos tal como los derivados de cribado de bibliotecas de péptidos para unión a una estructura de superficie celular particular o tipo celular particular, péptidos RGD cíclicos o lineales, hidratos de carbono sintéticos o naturales tal como ácido siálico, galactosa o manosa o ligandos sintéticos derivados de hacer reaccionar un hidrato de carbono, por ejemplo, con un péptido, anticuerpos que reconocen específicamente

estructuras de superficie celular, ácido fólico, factor de crecimiento epidérmico y péptidos derivados del mismo, transferrina, anticuerpos anti-receptor de transferrina, nanocuerpos y fragmentos de anticuerpos, fármacos aprobados que se unen a moléculas de superficie celular conocidas, etc.

- 5 En cuanto a que cualquiera de los grupos  $R^1$  a  $R^6$  en las fórmulas (IV), (IVa), (IVb) y (IVc) sean una cadena de poli(etilenglicol), el peso molecular preferido de la cadena de poli(etilenglicol) es 100-20.000 g/mol, más preferiblemente 1.000-10.000 g/mol y lo más preferiblemente es 1.000-5.000 g/mol.

10 Como se ha indicado anteriormente, uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en las fórmulas (I) y las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), (IIIa)-(IIIId) y (IVa)-(IVc) pueden estar protonados para producir un oligómero o polímero o lipidoide en una forma catiónica, típicamente una forma oligocatiónica o policatiónica. Se entenderá que los grupos amino primarios y/o secundarios y/o terciarios de la fórmula (I) y las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), (IIIa)-(IIIId) y (IVa)-(IVc) pueden actuar como aceptores de protones, especialmente en agua y soluciones acuosas, incluyendo fluidos fisiológicos. Por tanto, los oligómeros, polímeros y lipidoide de la presente divulgación típicamente tienen una carga positiva global en una solución acuosa a un pH de menos de 7,5. Una solución acuosa, como se denomina en el presente documento, es una solución en donde el solvente comprende el 50% (vol./vol.) o más, preferiblemente el 80 o 90% o más, y lo más preferiblemente el 100% de agua. Además, si las composiciones según la invención están en contacto con un fluido fisiológico que tiene un pH de menos de 7,5, incluyendo, por ejemplo, sangre y fluido pulmonar, los grupos de fórmula (I) y las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), (IIIa)-(IIIId) y (IVa)-(IVc) típicamente contienen uno o más grupos amino protonados. Los valores de  $pK_a$  de estos compuestos se pueden determinar por titulación ácido-base usando un titulador de  $pK_a$  automatizado. La carga neta a un valor de pH determinado se puede calcular después a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbach. Según Geall y col. (J. Geall et al. 1998, Chem Commun, 1403-1404), es importante reconocer que cualquier carga está compartida a través de varios de los centros básicos y que no se puede atribuir a un único punto. Por ejemplo, 1,9-diamino-3,7-diazanonano (propil/etil/propil) tiene  $pK_a$  de 9,3, 7,6 y 5,7, lo que significa que a pH fisiológico fracciones sustanciales de los grupos amino están en estado protonado y sin protonar.

30 Sin embargo, como entenderá el lector experto, los oligómeros, polímeros y lipidoide según la divulgación, así como las composiciones según la invención también se pueden proporcionar como una forma de sal seca que contiene el oligómero, polímero o lipidoide en una forma catiónica.

35 Como además se entenderá, los contraiones (aniones) para las cargas positivas de los grupos amino protonados en las composiciones según la invención que comprenden un oligómero, polímero o lipidoide y ARN monocatenario tal como ARNm, típicamente están proporcionados por fracciones aniónicas contenidas en el ARN. Si los grupos cargados positivamente están presentes en exceso comparados con las fracciones aniónicas en el ARN, las cargas positivas se pueden equilibrar por otros aniones, tal como  $Cl^-$  o  $HCO_3^-$  encontrados típicamente en fluidos fisiológicos.

40 Las oligo(alquilenamina)s adecuadas para uso en el contexto de la presente invención se pueden obtener comercialmente de suministradores químicos conocidos, o se pueden sintetizar por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, van Alphen 1936, Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, 55, 835-840). Cualquier modificación que pueda ser necesaria se puede lograr por métodos estándar de síntesis química.

#### 45 *Estructuras de oligómeros/polímeros*

Como se ha indicado anteriormente, los grupos de la fórmula (I) y las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId) y (IIIa)-(IIIId) pueden estar unidos a, o pueden proporcionar una variedad de estructuras de esqueleto de oligómeros o polímeros.

50 En general, el oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId) también se pueden denominar un esqueleto de polímero que porta una pluralidad de grupos de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), como una cadena lateral y/o un grupo terminal. Los esqueletos de polímero que pueden portar una pluralidad de grupos de fórmula (II) y las formas de realización preferidas de la misma, incluyendo los grupos de fórmula (IIa) a (IIId), como una cadena lateral o un grupo terminal incluyen polímeros lineales, ramificados o entrecruzados, así como polímeros dendríticos (dendrimeros). Los polímeros incluyen polímeros sintéticos o biológicos. Son preferidas estructuras de esqueleto de polímeros lineales o ramificados. Esto aplica también para oligómeros que portan los grupos de fórmula (II) y las formas de realización preferidas de la misma incluyendo los grupos de fórmula (IIa) a (IIId) como una cadena lateral o un grupo terminal, la diferencia es que un esqueleto de polímero típicamente comprende 10 o más unidades repetitivas, mientras que un esqueleto de oligómero comprende de 2 a 9, preferiblemente de 3 a 9 unidades repetitivas. En general, entre los oligómeros y polímeros que comprenden una pluralidad de grupos de fórmula (II) y las formas de realización preferidas de la misma incluyendo los grupos de fórmula (IIa) a (IIId), como una cadena lateral o un grupo terminal, los polímeros son preferidos.

Las cadenas laterales o grupos terminales de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId) se pueden injertar convenientemente a un esqueleto de polímero u oligómero usando funcionalidades y reacciones químicas conocidas con el fin de proporcionar los polímeros según la divulgación.

5 Como entenderá el experto lector, el término "injertar a un polímero u oligómero" no excluye la opción que las cadenas laterales se unan a los monómeros antes de la reacción de polimerización. Como se indica por la valencia libre en la fórmula (II), las cadenas laterales o grupos terminales están unidos al esqueleto de polímero u oligómero a través de un enlace covalente.

10 Se entenderá además que los términos "polímero" y "oligómero" como se usan en el presente documento abarcan polímeros y oligómeros obtenibles mediante una amplia variedad de reacciones, tal como reacciones de poliadición y policondensación, incluyendo polimerización por radicales libres, polimerización aniónica o catiónica, así como polímeros y oligómeros obtenibles por reacciones de acoplamiento por etapas (por ejemplo, procesos de crecimiento en etapas).

15 Por tanto, los polímeros u oligómeros adecuados como esqueletos de polímero u oligómero para portar una pluralidad de grupos de fórmula (II), o sus formas de realización preferidas incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), como una cadena lateral o un grupo terminal incluyen polímeros u oligómeros tal como poliamidas, poliésteres, polímeros con un esqueleto de cadena de carbono, y polisacáridos. Los esqueletos de polímero u oligómero ejemplares están proporcionados como poli(aminoácidos) que comprenden una pluralidad de unidades de ácido glutámico o aspártico, tal como poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico), proteínas, polialquinos, poliaminas, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido polimaleico, polisulfonato, sulfonato de poliestireno, polifosfato, polisulfato de pentosano, poli(ácido vilnilfosfórico), poli(butadieno-co-ácido maleico), poli(acrilato de etilo-co-ácido acrílico), poli(etileno-co-ácido acrílico), poli(etileno-co-anhidro maleico), poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico), poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico), poli(ácido estirenosulfónico-co-ácido maleico), poli(cloruro de vinilo-co-acetato de vinilo-co-ácido maleico), hidratos de carbono tal como heparina, sulfato de heparán, poli(ácido glucurónico), poli(ácido galacturónico), ácido hialurónico, poli(ácidos urónicos) en general, o dendrímeros terminados en carboxi. Entre ellos, poli(aminoácidos) que comprenden una pluralidad de unidades de ácido glutámico o aspártico, tal como poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico) y ácido poli(met)acrílico son preferidos. Los más preferidos para los fines de la presente invención son ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico.

20 Preferiblemente, los esqueletos de polímero tienen un grado de polimerización (en términos del número medio de unidades polimerizadas, determinado, por ejemplo, a través de cromatografía de penetración en gel (GPC)) de 10 a 10.000, preferiblemente de 50 a 5.000.

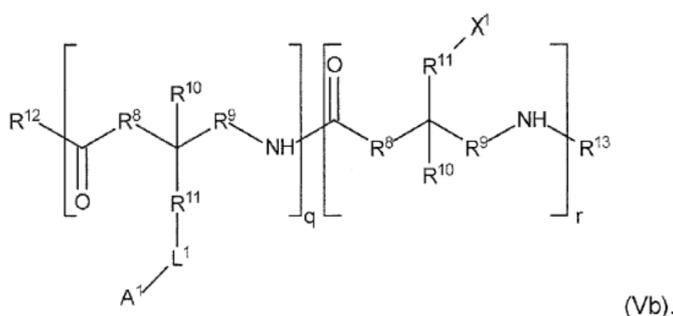
35 Los polímeros según la divulgación pueden estar proporcionados por homopolímeros o copolímeros. Los copolímeros pueden contener unidades polimerizadas con diferentes estructuras, de modo que el esqueleto de polímero sea un copolímero. Alternativamente, los copolímeros se pueden obtener en la base de un homopolímero como un esqueleto de polímero, en donde no todas las unidades polimerizadas portan un grupo de fórmula (II), o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId). Se entenderá que también existe la opción de combinar estas dos alternativas injertando cadenas laterales a un cierto porcentaje de las unidades en un esqueleto de copolímero. Los copolímeros pueden estar en forma de copolímeros aleatorios, en gradiente o en bloque.

40 Si los polímeros según la divulgación son homopolímeros, todas las unidades polimerizadas portan un grupo de fórmula (II), o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId). Si los polímeros según la divulgación son copolímeros, se prefiere que el 5 al 100% de todas las unidades polimerizadas porten un grupo de fórmula (II), o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), más preferiblemente del 25 al 100%, y en particular del 50 al 100%. Los porcentajes se dan en términos del número de unidades que portan un grupo de fórmula (II), relativo a todas las unidades polimerizadas.

50 Los copolímeros anteriores pueden contener, además del grupo de fórmula (II), o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId) también otras cadenas laterales o grupos terminales que contienen amina. Sin embargo, se prefiere que ninguna cadena lateral o grupo terminal de la fórmula  $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_x\text{-(NH(CH}_2\text{)}_2\text{)}_y\text{-NH}_2$ , en donde x indica un número entero de 1 a 5 e y indica un número entero de 1 a 5, estén contenidos en los polímeros según la divulgación.

55 Las poliamidas preferidas que portan una cadena lateral de fórmula (II) o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIId), contienen unidades repetitivas de la fórmula (V):

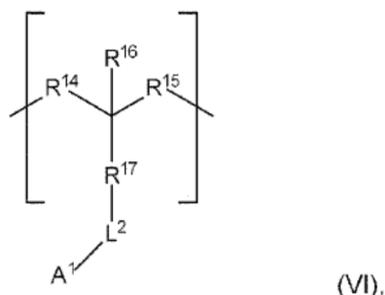




En estas fórmulas  $R^8$ ,  $R^9$ ,  $R^{10}$ ,  $R^{11}$ ,  $L^1$  y  $A^1$  se definen como para la fórmula (V), incluyendo formas de realización preferidas de la misma.  $R^{12}$  se selecciona de OH o alcoxi de C1-C6,  $-NH_2$ , una cadena de poli(etilenglicol), o un ligando de receptor.  $R^{13}$  es H, un grupo protector para un grupo amino, una cadena de poli(etilenglicol), o un ligando de receptor.  $X^1$  se selecciona de H,  $-NH_2$ ,  $-COOH$ , y  $-COOR''$ , siendo  $R''$  alquilo de C1-C6, una cadena de poli(etilenglicol), o un ligando de receptor. En la fórmula (Va), s (que indica el número medio de unidades polimerizadas, determinado, por ejemplo, mediante cromatografía de penetración en gel (GPC)) es de 10 a 10.000, preferiblemente de 50 a 5.000. En la fórmula (Vb), las unidades en corchetes son unidades repetitivas que se pueden organizar en el polímero en cualquier orden, incluyendo en particular una organización aleatoria, alternante o en bloques. La suma de  $q + r$  (que indica el número medio de unidades polimerizadas, determinado, por ejemplo, mediante cromatografía de penetración en gel (GPC)) es de 10 a 10.000, preferiblemente de 50 a 5.000 y el cociente  $q/(q + r)$  varía de 0,05 a 1, preferiblemente de 0,25 a 1, y los más preferiblemente de 0,5 a 1.

Los poli(aminoácidos) preferidos ejemplares, que se pueden modificar convenientemente por cadenas laterales de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId) son poli(ácido glutámico), poli(ácido aspártico), polilisina, poliornitina o poli(aminoácidos) que contienen unidades de ácido glutámico, ácido aspártico, ornitina y/o lisina. Más preferido es poli(ácido glutámico).

Los polímeros preferidos con esqueleto de cadena carbonada que portan una cadena lateral de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId) contienen unidades repetitivas de la fórmula (VI):



en donde las variables tienen los siguientes significados:

$R^{14}$  y  $R^{15}$  se seleccionan independientemente de un enlace y alcanodiilo de C1-C6;

$R^{16}$  se selecciona de H y alquilo de C1-C6;

$R^{17}$  se selecciona de un enlace y alcanodiilo de C1-C6,

$L^2$  es un grupo enlazador divalente, y

$A^1$  representa un grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (II).

Preferiblemente,  $R^{14}$  es un enlace y  $R^{15}$  es un enlace o  $-CH_2-$ . Más preferiblemente  $R^{14}$  es un enlace y  $R^{15}$  es  $-CH_2-$ .

Preferiblemente,  $R^{16}$  se selecciona de H y metilo.  $R^{17}$  es preferiblemente un enlace o  $-CH_2-$ .

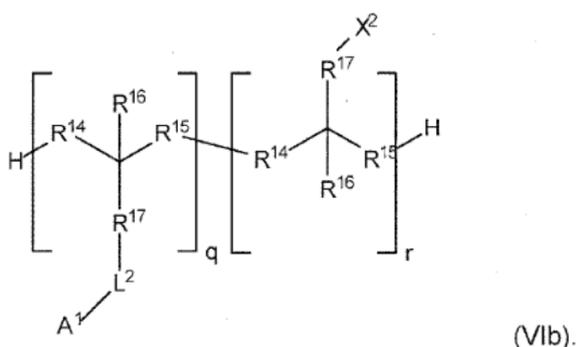
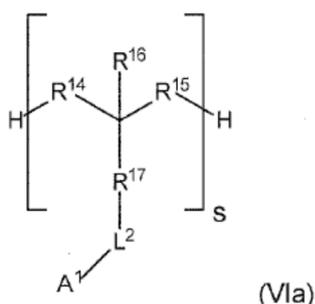
El grupo enlazador  $L^2$  tiene, en una forma de realización preferida, la estructura  $-Z^3-R^1-Z^4-$ , en donde  $Z^3$  se selecciona de un enlace,  $-NH-(C=O)-$ ,  $-NH-C(S)-NH-$ ,  $-NH-(C=O)-NH-$ ,  $-NH-S(O)_2-$ ,  $-NH-CH_2-C(OH)-$ ,  $-NH-(C=O)-O-$ ,  $-NH-C(NH)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-CH=N-NH-(C=O)-$ , -enlace tioéter-,  $-S-CH_2-(C=O)-$ ,  $-S-$ ,  $-S-CH_2-CH-NH_2-$ , y -enlace aril tioéter-;  $R^1$  se selecciona de un enlace, alcanodiilo de C1-C6 y  $-(CH_2-CH_2-O)_n-H$  con  $n = 1-3$ ; y  $Z^4$  se selecciona de un enlace,  $-(C=O)-$ ,  $-NH-C(S)-$ ,  $-NH-(C=O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-O-P(O)_2-$ ,  $-CH(OH)-CH_2-$ ,  $-O-(C=O)-$  y  $-C(NH)-$ . Preferiblemente,  $Z^3$  se selecciona de un enlace,  $-NH-(C=O)-$ ,  $-NH-(C=O)-NH-$ ,  $-NH-(C=O)-O-$ ,  $-NH-C(NH)-$ ;  $R^1$  se selecciona de un enlace y alcanodiilo de C1-C6 y  $Z^4$  se selecciona de un enlace,  $-(C=O)-$ ,  $-NH-(C=O)-$ , y  $-O-(C=O)-$ ; con la condición de que uno de  $Z^3$  y  $Z^4$  sea diferente de un enlace. Es lo más preferido para  $L^2$  que  $Z^3$  y  $R^1$  sean un enlace y  $Z^4$  sea  $-(C=O)-$ .

45

A<sup>1</sup> es preferiblemente una de las formas de realización preferidas definidas en el presente documento para el grupo oligo(alquilenamina) de fórmula (II), en particular uno de los grupos de fórmula (IIa)-(IIc).

5 En las poliamidas preferidas que contienen la unidad repetitiva de fórmula (VI), se prefiere que del 5 al 100% de todas las unidades polimerizadas sean unidades de fórmula (VI), más preferiblemente del 25 al 100%, y en particular del 50 al 100%. Los porcentajes se dan en términos del número de unidades de fórmula (VI), relativo a todas las unidades polimerizadas. En las definiciones y definiciones preferidas dadas para las variables de fórmula (VI), las unidades repetitivas de fórmula (V) pueden ser iguales o diferentes en el polímero preferido según la divulgación.

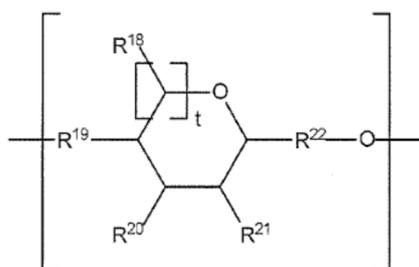
10 Particularmente preferidas como polímeros con un esqueleto de cadena carbonada que portan cadenas laterales de fórmula (II), o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIc), son los polímeros de fórmula (VIa) y (VIb).



15 En estas fórmulas R<sup>14</sup>, R<sup>15</sup>, R<sup>16</sup>, R<sup>17</sup>, L<sup>2</sup> y A<sup>1</sup> se definen como para la fórmula (VI), incluyendo formas de realización preferidas de la misma. X<sup>2</sup> se selecciona de -COOH, y -COOR", siendo R" alquilo de C1-C6, una cadena de poli(etilenglicol), o un ligando de receptor. En la fórmula (VIa), s (que indica el número medio de unidades polimerizadas, determinado, por ejemplo, mediante cromatografía de penetración en gel (GPC)) es de 10 a 10.000, preferiblemente de 50 a 5.000. En la fórmula (VIb), las unidades en corchetes son unidades repetitivas que se pueden organizar en el polímero en cualquier orden, incluyendo en particular una organización aleatoria, alternante o por bloques. La suma de q + r (que indica el número medio de unidades polimerizadas, determinado, por ejemplo, mediante cromatografía de penetración en gel (GPC)) es de 10 a 10.000, preferiblemente de 50 a 5.000 y el cociente q/(q + r) varía de 0,05 a 1, preferiblemente de 0,25 a 1, y los más preferiblemente de 0,5 a 1.

25 Los polímeros preferidos ejemplares con un esqueleto de cadena carbonada, que se pueden modificar convenientemente por cadenas laterales de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIc) son ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico o ácido polimaleico, y más preferidos son ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico.

30 Los polisacáridos preferidos que portan una cadena lateral de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IIc), contienen las unidades repetitivas de la fórmula (VII):



(VII)

en donde las variables tienen los siguientes significados:

5  $R^{19}$  y  $R^{22}$  se seleccionan independientemente de un enlace y  $-(CH_2)-$ ;  $t$  es 0 o 1; y uno de  $R^{18}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  representa  $-L^3-A^1$ , en donde  $L^3$  es un grupo enlazador divalente y  $A^1$  representa un grupo oligo(alkuilenamina) de fórmula (II), y los otros se seleccionan independientemente de  $-H$ ,  $-OH$ , y  $-(CH_2)_n-OH$ , en donde  $n = 1$  o  $2$ .

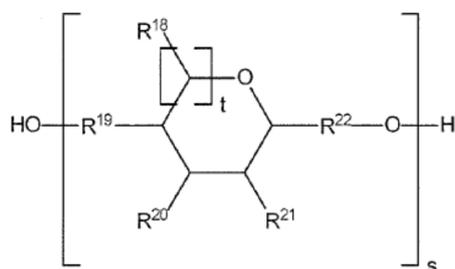
10 Preferiblemente,  $R^{19}$  y  $R^{22}$  son un enlace. Preferiblemente, uno de  $R^{18}$ ,  $R^{20}$  y  $R^{21}$  representa  $-L^3-A^1$ , en donde  $L^3$  es un grupo enlazador divalente y  $A^1$  representa un grupo oligo(alkuilenamina) de fórmula (II), y los otros son  $-OH$ .

15 El grupo enlazador  $L^3$  tiene, en una forma de realización preferida, la estructura  $-Z^5-R'-Z^6-$ , en donde  $Z^5$  se selecciona de un enlace,  $-NH-(C=O)-$ ,  $-NH-C(S)-NH-$ ,  $-NH-(C=O)-NH-$ ,  $-NH-S(O)_2-$ ,  $-NH-CH_2-C(OH)-$ ,  $-NH-(C=O)-O-$ ,  $-NH-C(NH)-$ ,  $-S-S-$ ,  $-CH=N-NH-(C=O)-$ , -enlace tioéter-,  $-S-CH_2-(C=O)-$ ,  $-S-$ ,  $-S-CH_2-CH-NH_2-$ , y -enlace aril tioéter-;  $R'$  se selecciona de un enlace, alcanodiilo de C1-C6 y  $-(CH_2-CH_2-O)_n-H$  con  $n = 1-3$ ; y  $Z^6$  se selecciona de un enlace,  $-(C=O)-$ ,  $-NH-C(S)-$ ,  $-NH-(C=O)-$ ,  $-S(O)_2-$ ,  $-O-P(O)_2-$ ,  $-CH(OH)-CH_2-$ ,  $-O-(C=O)-$  y  $-C(NH)-$ , con la condición de que uno de  $Z^5$  y  $Z^6$  sea diferente de un enlace. Preferiblemente,  $Z^5$  se selecciona de un enlace,  $-NH-(C=O)-$ ,  $-NH-(C=O)-NH-$ ,  $-NH-(C=O)-O-$ ,  $-NH-C(NH)-$ ;  $R'$  se selecciona de un enlace y alcanodiilo de C1-C6 y  $Z^6$  se selecciona de un enlace,  $-(C=O)-$ ,  $-NH-(C=O)-$ , y  $-O-(C=O)-$ ; con la condición de que uno de  $Z^5$  y  $Z^6$  sea diferente de un enlace. Es lo más preferido para  $L^3$  que  $Z^5$  y  $R'$  sean un enlace y  $Z^6$  sea  $-(C=O)-$ .

25  $A^1$  es preferiblemente una de las formas de realización preferidas definidas en el presente documento para el grupo oligo(alkuilenamina) de fórmula (II), en particular uno de los grupos de fórmula (IIa)-(IId).

30 En los polisacáridos preferidos que contienen la unidad repetitiva de fórmula (VII), se prefiere que del 5 al 100% de todas las unidades polimerizadas sean unidades de fórmula (VII), más preferiblemente del 25 al 100%, y en particular del 50 al 100%. Los porcentajes se dan en términos del número de unidades de fórmula (VII), relativo a todas las unidades polimerizadas. En las definiciones y definiciones preferidas dadas para las variables de fórmula (VII), las unidades repetitivas de fórmula (VII) pueden ser iguales o diferentes en el polímero preferido según la divulgación.

Particularmente preferidos como polisacáridos que portan cadenas laterales de fórmula (II) o las formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId) son los polímeros de fórmula (VIIa).



(VIIa)

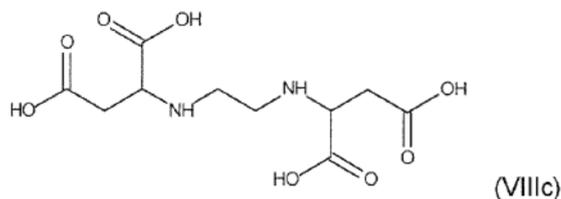
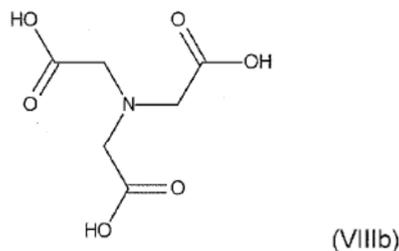
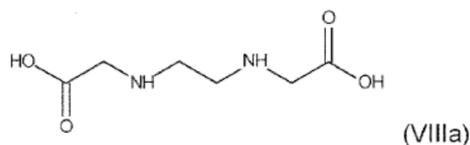
35 En esta fórmula,  $R^{18}$ ,  $R^{19}$ ,  $R^{20}$ ,  $R^{21}$ ,  $R^{22}$  y  $t$  se definen como para la fórmula (VII), incluyendo las formas de realización preferidas de la misma,  $s$  (que indica el número medio de unidades polimerizadas, determinado, por ejemplo, mediante cromatografía de penetración en gel (GPC)) es de 10 a 10.000, preferiblemente de 50 a 5.000.

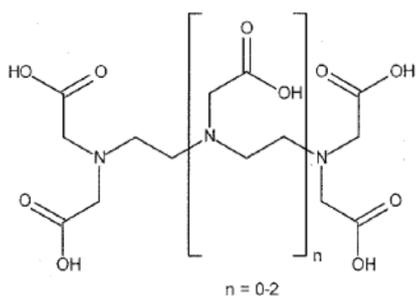
40 Los polímeros ejemplares con un esqueleto de polisacárido, que se pueden modificar convenientemente mediante las cadenas laterales de fórmula (II) o las formas de realización de la misma incluyendo las fórmula (IIa)-(IId) son almidón, amilosa, amilopectina, glucógeno, celulosa, dextrano, dextrina, ciclodextrina, quitina, quitosano, inulina, pululano, escleroglucano, curdlano, calosa, laminarina, crisolaminarina, xilano, arabinoxilano, manano, fucoidano y galactomanano, proteoglicanos, poliglucuronano, poliglucuronano, ácido celourónico, ácido quitourónico, ácidos

5 poliurónicos, pectinas, glucosaminoglucanos, heparina, sulfato de heparina, sulfatos de condroitina, sulfato de dermatano, ácido hialurónico, agar, alginato de sodio, ácido algínico, goma arábica, carragenano, fucoidano, fucogalactano, octaacetato de quitobiosa, undecaacetato de quitotriosa, maltooligosacáridos. Son preferidos quitosanos, hidroxietil almidón, dextrano, dextrina, ciclodextrinas ( $\alpha$ -ciclodextrina,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\gamma$ -ciclodextrina, y  $\delta$ -ciclodextrina).

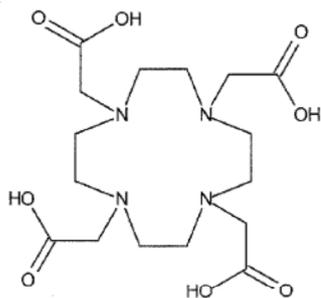
10 Varias estructuras de dendrímeros que se pueden modificar para contener una pluralidad de grupos terminales de fórmula (II) o las formas preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId) en sus estructuras ramificadas se conocen en la técnica, y se describen, por ejemplo, poliamidoaminas (PAMAM) (Tomalia et al. 1990, *Angew. Chem. Int. Edn. Engl.* 29, 138-175) o PAMAM fracturadas (Tang et al, 1996, *Bioconjug. Chem.* 7, 703-714), poliaminas (Hawker et al. 1990, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 7638-7647), poliamidas (polipéptidos) (Sadler et al. 2002, *J. Biotechnol.* 90, 195-229), poli(aril éteres) (Hawker et al. 1990, *J. Am. Chem. Soc.* 112, 7638-7647), poliésteres (Ihre et al. 1996, *J. Am. Chem. Soc.* 118, 6388-6395, Grinstaff et al. 2002, *Chemistry* 8, 2838-2846), hidratos de carbono (Turnbull et al. 2002, *J. Biotechnol.* 90, 231-255), ADN (Nilsen et al. 1997, *J. Theor. Biol.* 187, 273-284, Li et al., 2004, *Nat. Mater.* 3, 38-42), lípidos (Ewert et al. 2006, *Bioconjug Chem.* 17, 877-88), poli(éter imina) (Thankappan et al. 2011, *Bioconjug Chem.* 22, 115-9.) triazina (Lim et al. 2012, *Adv Drug Deliv Rev.* 15, 826-35) y poligliceroles (Fischer et al. 2010, *Bioconjug Chem.* 21, 1744-52).

20 Se entenderá que los oligómeros que comprenden una pluralidad de grupos de fórmula (II) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId) como grupo terminales también abarcan oligómeros en donde una pluralidad de tales grupos están covalentemente unidos como grupos terminales a una estructura central polifuncional que proporciona grupos funcionales adecuados para la unión de una pluralidad de grupos de fórmula (II) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId). Estas estructuras centrales polifuncionales incluyen, en particular, ácidos carboxílicos o poliaminas divalentes, trivalentes o de mayor valencia. Si es necesario, los grupos funcionales de las estructuras centrales polifuncionales se pueden activar o hacer reaccionar con un grupo enlazador con el fin de permitir la unión de grupos de un grupo de fórmula (II) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIa)-(IId). Las estructuras centrales ramificadas ejemplares que se pueden modificar para portar una pluralidad de tales grupos se ilustran por las fórmulas (VIIIa-g) a continuación:

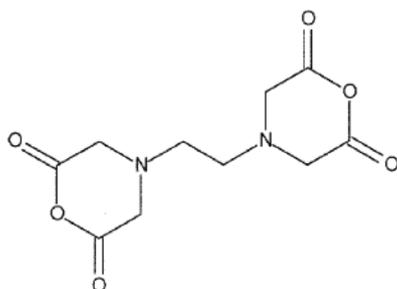




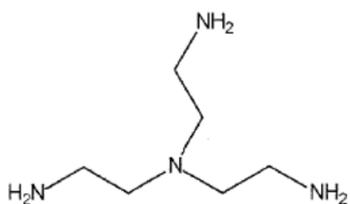
(VIII d)



(VIII e)



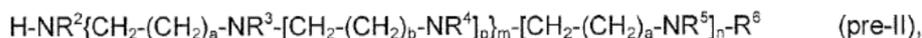
(VIII f)



(VIII g)

5 Como reconocerá un experto en la materia, los polímeros u oligómeros que comprenden el grupo (II) o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIa)-(II d) como una cadena lateral y/o un grupo terminal se pueden obtener fácilmente por una variedad de rutas sintéticas a través de acoplamiento de oligo(alquilenaminas) a esqueletos de polímeros que comprenden o se han modificado para comprender grupos funcionales susceptibles a química de acoplamiento. Tales grupos funcionales incluyen -COOH, -CO-, -CHO, -SO<sub>3</sub>H, -PO<sub>4</sub>H, -NH-, -NH<sub>2</sub>, -OH, o -SH. Como se entenderá, también puede ser posible modificar monómeros adecuados con los grupos de fórmula (II) antes de su  
10 polimerización para proporcionar polímeros u oligómeros según la divulgación que contienen una cadena lateral y/o un grupo terminal de fórmula (II). Sin embargo, la modificación de un polímero es en general preferida.

15 Por ejemplo, polímeros parentales (es decir, los polímeros que proporcionan el esqueleto de polímero en los polímeros según la divulgación) que comprenden grupos ácido carboxílico son susceptibles a acoplamiento directo, donde sea necesario por activación, por ejemplo, usando carbodiimida y posterior formación de enlace amida con una oligo(alquilendiamina) de fórmula (pre-II) a continuación, en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como para la fórmula (II) para proporcionar las cadenas laterales y/o grupos terminales de fórmula (II).

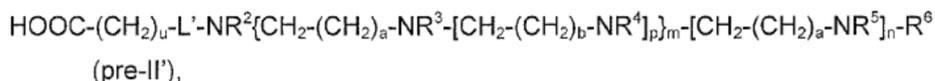


20 Si es necesario, el compuesto de fórmula (pre-II) puede estar protegido en uno o todos de sus grupos amino terminales y/o internos secundarios usando un grupo protector convencional para un grupo amino tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/138380, preferiblemente t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), o carbobenciloxi (Cbz).

Tales reacciones se realizan preferiblemente en presencia de un exceso de grupos amino reactivos de la oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-II) sobre los grupos ácido carboxílico del polímero parental si no se desean reacciones de entrecruzamiento. Dependiendo de la naturaleza del polímero parental, la reacción de acoplamiento se puede realizar en solventes acuosos u orgánicos. Las condiciones de acoplamiento adecuadas se conocen bien en la técnica de química de péptidos y bioconjugados (Greg T. Hermanson, Bioconjugate Techniques, 2ª Edición, Academic Press 2008). Como se ha indicado anteriormente, los esqueletos de polímero adecuados incluyen, pero no están limitados a, poli(aminoácidos) que comprenden una pluralidad de unidades de ácido glutámico o aspártico, tal como poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico), proteínas, polialquinos, poliaminas, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido polimaleico, polisulfonato, sulfonato de poliestireno, polifosfato, polisulfato de pentosano, poli(ácido vilnilfosfórico), poli(butadieno-co-ácido maleico), poli(acrilato de etilo-co-ácido acrílico), poli(etileno-co-ácido acrílico), poli(etileno-co-anhidrido maleico), poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico), poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico), poli(ácido estirenosulfónico-co-ácido maleico), poli(cloruro de vinilo-co-acetato de vinilo-co-ácido maleico), hidratos de carbono tal como heparina, sulfato de heparán, poli(ácido glucurónico), poli(ácido galacturónico), ácido hialurónico, poli(ácidos urónicos) en general, o dendrímeros terminados en carboxi.

Para otras formas de realización de la presente divulgación, el polímero que comprende las cadenas laterales y/o grupos terminales de fórmula (II) se puede obtener por aminación reductora de un polímero parental. Los hidratos de carbono o azúcares se pueden oxidar a aldehídos, seguido por reacción con una oligo(alquilenamina) que produce una imina que se puede reducir, por ejemplo, con cianoborohidruro de sodio para dar una amina.

Para aun una forma de realización adicional de la presente divulgación, una oligo(alquilenamina) se puede derivar en una primera etapa para producir una oligo(alquilamina) terminada en carboxi, por ejemplo, de fórmula (pre-II') que es susceptible a acoplamiento a grupos hidroxilo y amino en un polímero parental:



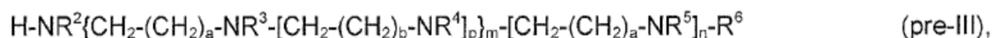
en donde u es un número entero de 1 a 6, L' es un enlace o -(CH<sub>2</sub>)-, y las otras variables se definen como para la fórmula (II). Si es necesario, cualquier grupo amino terminal y/o interno secundario en el compuesto de fórmula (pre-II) o (pre-II') puede estar protegido usando un grupo protector convencional para un grupo amino tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/138380, preferiblemente t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), o carbobenciloxi (Cbz).

Para este fin, la oligo(alquilenamina) se puede hacer reaccionar con un anhidrido de ácido dicarboxílico, un ácido dicarboxílico o un aldehído produciendo la estructura (pre-II'). Incluso aunque la estructura (pre-II') se puede obtener sin proporcionar las aminas en la oligo(alquilenamina) (pre-II) con grupos protectores ortogonales, se puede hacer preferentemente así. La estructura (pre-II') permite la modificación de, por ejemplo, poli(lisina), poli(ornitina) o poli(vinilamina) por acoplamiento directo, produciendo la formación de enlace amida. Tras la terminación de la reacción de acoplamiento, cualquier grupo protector se puede eliminar por métodos convencionales. El polímero resultante se puede después purificar, por ejemplo, por diálisis o cromatografía de intercambio iónico o exclusión molecular o fase inversa o interacción hidrofóbica.

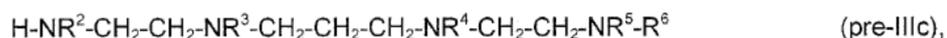
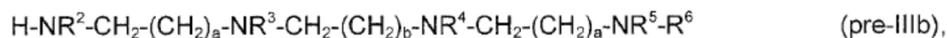
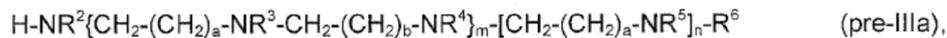
Los productos intermedios y finales se pueden purificar por precipitación, diálisis o cromatografía de exclusión molecular después de que los grupos protectores de amino se hayan eliminado, y antes de la etapa de acoplamiento final en el caso de dendrímeros.

Los polímeros u oligómeros que contienen una pluralidad de unidades repetitivas de fórmula (III) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(IIIId) pueden ser polímeros lineales, ramificados o entrecruzados, o polímeros dendríticos (dendrímeros). Preferiblemente, los polímeros u oligómeros que contienen una pluralidad de unidades repetitivas de fórmula (III) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(IIIId) contienen al menos el 25%, más preferiblemente al menos el 40% de tales unidades repetitivas, en términos del número de unidades de fórmula (III) relativo al número total de unidades repetitivas en el polímero u oligómero. Es especialmente preferido que el 50% o más de todas las unidades repetitivas en los polímeros u oligómeros que contienen una pluralidad de unidades repetitivas de fórmula (III) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(IIIId), sean tales unidades. Las unidades repetitivas restantes están proporcionadas por moléculas que permiten el acoplamiento de las unidades repetitivas de fórmula (III) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(IIIId), en particular unidades derivadas de ácidos carboxílicos divalentes, trivalentes o de mayor valencia.

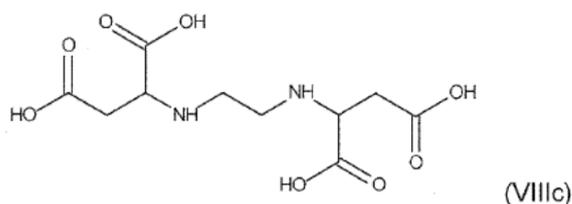
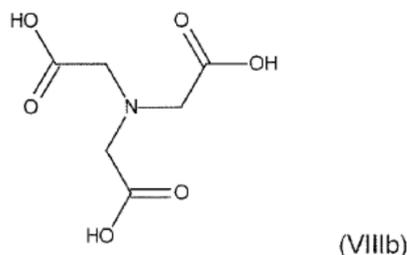
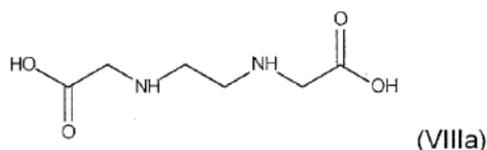
Los polímeros u oligómeros que contienen una pluralidad de unidades repetitivas de fórmula (III) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(IIIId) se pueden obtener convenientemente usando un compuesto de fórmula (pre-III):

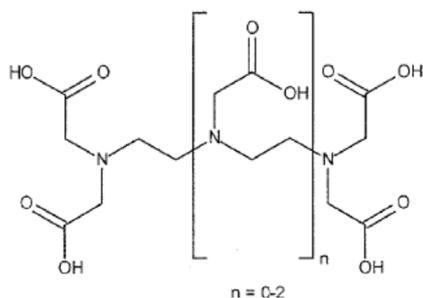


- 5 donde "pre" indica que la fórmula (pre-III) es un precursor de la fórmula (III) y en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como para la fórmula (III) y R<sup>6</sup> se define como para la fórmula (II), incluyendo formas de realización preferidas de las mismas, o preferiblemente usando un compuesto de fórmulas (pre-IIIa)-(pre-III d), en donde las variables se definen como en la fórmula (IIIa), (IIIb), (IIIc) o (III d), respectivamente:

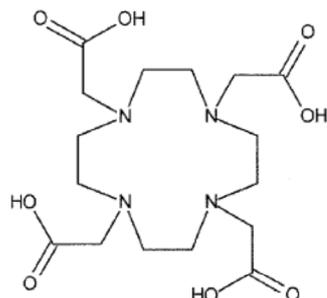


- 10 Estos compuestos que portan grupos amino terminales se pueden unir para formar polímeros lineales, ramificados, entrecruzados o dendríticos usando reacciones de acoplamiento convencionales. Los compuestos adecuados que se pueden usar como reactivos en tales reacciones de acoplamiento incluyen ácidos carboxílicos divalentes, trivalentes y de mayor valencia. Los compuestos ejemplares que están comercialmente disponibles y que se pueden hacer reaccionar con los compuestos enlazadores de fórmula (pre-III), (pre-IIIa), (pre-IIIb), (pre-IIIc) y (pre-III d),  
 15 respectivamente, están ilustrados por las fórmulas (VIIIa-g) a continuación:

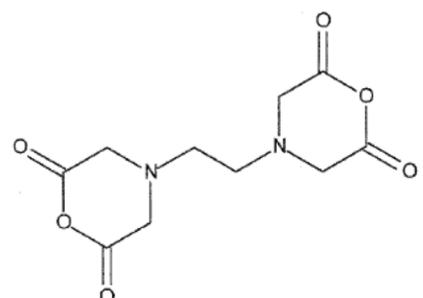




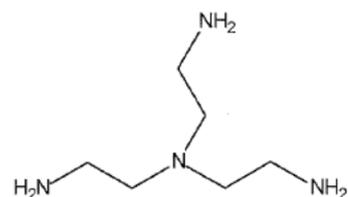
(VIII d)



(VIII e)



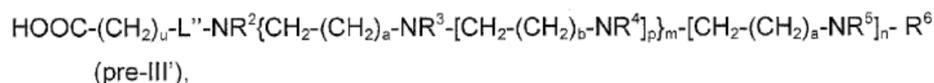
(VIII f)



(VIII g)

5 Mientras que la reacción directa de ácidos carboxílicos polivalentes con diaminas se puede lograr convenientemente, se entenderá que los compuestos enlazadores no están limitados a los que proporcionan grupos ácido carboxílico (o formas activadas de los mismos). Por ejemplo, el compuesto de fórmula (VIII g) se puede hacer reaccionar con un compuesto de fórmula (pre-III) después de que una diamida del compuesto de fórmula (pre-III) se haya formado con un ácido dicarboxílico, tal como ácido succínico.

10 Además, una oligo(alquilenamina) se puede derivar en una primera etapa para producir una oligo(alquilenamina) terminada en carboxi de fórmula (pre-III'), por ejemplo, como se ha descrito anteriormente para la preparación de compuestos de fórmula (pre-II')



15 en donde u es un número entero de 1 a 6, L'' es un enlace o -(CH<sub>2</sub>)-, y las otras variables se definen como para la fórmula (III), y R<sup>6</sup> se define como para la fórmula (II). Si es necesario, cualquier grupo amino interno secundario en el compuesto de fórmula (pre-III') puede estar protegido usando un grupo protector convencional para un grupo amino tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/138380, preferiblemente t-butoxicarbonilo (Boc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), o carbobenciloxi (Cbz). Si el grupo terminal amino restante -NR<sup>5</sup>R<sup>6</sup> está presente en una forma no protegida/en una forma que permite la formación de amida con un grupo ácido carboxílico, los compuestos de fórmula (pre-III') se pueden polimerizar u oligomerizar para proporcionar un oligómero o polímero que

comprende una pluralidad de grupos oligo(alquilenamina) de fórmula (III), o formas de realización preferidas de la misma incluyendo las fórmulas (IIIa)-(III d) como unidades repetitivas. Tales polímeros pueden ser lineales o ramificados.

5 Por ejemplo, la estructura (pre-III') se puede usar para formar estructuras ramificadas ya sea por polimerización aleatoria o de una manera definida. La copolimerización se puede activar in situ en una mezcla de oligo(alquilenamina), opcionalmente con grupos amino internos protegidos y poli-ácidos carboxílicos (VIIIa-VIIIg) en solvente acuoso u orgánico por activación de carbodiimida.

10 También se pueden preparar dendrímeros que contienen una pluralidad de grupos de fórmula (III) o sus formas de realización preferidas, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(III d) como unidades repetitivas, por ejemplo, usando moléculas de acoplamiento polivalentes. Un dendrímero es una molécula polimérica compuesta de múltiples monómeros perfectamente ramificados que emanan radialmente de un núcleo central, reminescente de un árbol, de donde los dendrímeros derivan su nombre (griego, dendra). Cuando el núcleo de un dendrímero se elimina, un número de fragmentos idénticos llamados dendrones permanece, el número de dendrones depende de la multiplicidad del núcleo central (2, 3, 4 o más). Un dendrón se puede dividir en tres regiones diferentes: el núcleo, el interior (o ramas) y la periferia (o grupos finales o terminales). El número de puntos de ramificación encontrados al moverse hacia fuera desde el núcleo del dendrón hacia su periferia define su generación (G-1, G-2, G-3); los dendrímeros de generaciones mayores son más grandes, más ramificados y tienen más grupos finales en su periferia que los dendrímeros de generaciones menores.

La síntesis puede ser o bien divergente, que produce crecimiento de tipo exponencial, o convergente, en cuyo caso los dendrones se hacen crecer por separado y se unen al núcleo en la etapa final. Los dendrímeros se preparan de por etapas, similar a los métodos usados para síntesis de polipéptidos y oligonucleótidos en fase sólida, y por tanto los productos son de tamaño teóricamente monodisperso, en oposición a la síntesis de polímeros tradicional donde el crecimiento de la cadena es estadístico y se obtienen productos polidispersos. Un producto monodisperso es extremadamente deseable no solo por reproducibilidad sintética, sino también para reducir la variabilidad experimental y terapéutica. En la práctica, un producto monodisperso se puede obtener fácilmente para dendrímeros de baja generación (hasta G-3), pero algunas veces a generaciones mayores la incapacidad para purificar dendrímeros perfectos de dendrímeros con defectos menores que son estructuralmente muy similares produce una desviación de la monodispersidad absoluta, aunque típicamente una ligera.

Los dendrímeros preferidos como polímeros según la presente divulgación que comprenden una pluralidad de oligo(grupos alquilenos) de fórmula (III) o formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IIIa)-(III d), tienen un número de generaciones que varían de G1 a G10, más preferiblemente de G2-G8 y en particular de G3-G6. El peso molecular de estos dendrímeros (ya que se puede calcular en base a los reactivos combinados en las etapas de reacción) preferiblemente varía de 1.500 a 1.000.000, más preferiblemente de 3.000 a 230.000, en particular de 6.000 a 60.000 y lo más preferiblemente de 15.000 a 30.000.

40 Para la producción de dendrímeros de poli(amidoamina) definidos se pueden usar estructuras (pre-III) y/o (pre-III') (protegidas) para la generación por etapas de un núcleo ramificado como ya se ha descrito en la bibliografía (por ejemplo, Lee et al. 2005, Nat Biotechnol 23, 1517-1526). Como molécula iniciadora se puede usar o bien un oligo(alquilamina) (por ejemplo, pre-III) activada por un ácido dicarboxílico, anhídrido o ácido acrílico o un ácido policarboxílico (por ejemplo, VIIIa-VIIIg). Este núcleo se usa para hacerlo reaccionar por etapas con una oligo(alquilamina) de estructura (pre-III) seguido por purificación y activación de los grupos amino terminales, por ejemplo, por ácido acrílico. Después de la purificación este núcleo se puede usar para añadir una capa adicional de oligo(alquilenamina)s. Las condiciones de reacción para obtener dendrímeros se han descrito en detalle en la bibliografía (véase, por ejemplo, Lee et al., loc. cit, y las referencias comprendidas en el mismo).

50 Según formas de realización adicionales, las oligo(alquilenamina)s terminadas en ambos lados con un grupo carboxi se pueden proteger en un lado, y/o se pueden proteger las aminas internas, si es necesario, y se puede copolimerizar con una diamina o estructura iniciadora dendrítica que tiene grupos amina en los terminales, o con la oligo(alquilenamina) misma.

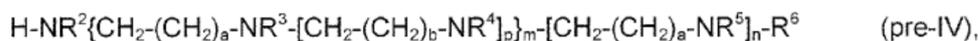
55 Los productos intermedios y finales se pueden purificar por precipitación, diálisis o cromatografía de exclusión molecular después de que los grupos protectores de amino se hayan eliminado, y antes de la etapa de acoplamiento final en el caso de dendrímeros.

60 En aún una forma de realización adicional, las oligo(alquilenamina)s que tienen un grupo carboxi terminal (o una forma adecuadamente protegida o activada del mismo) y un grupo amino terminal (o una forma adecuadamente protegida del mismo) de fórmula (pre-III') se pueden usar para la generación por etapas de una estructura peptídica lineal o ramificada completamente definida, de forma similar a lo descrito en el documento WO 2011/154330 y en (Schaffert et al. 2011, Angew Chem Int Ed Engl 50(38), 8986-9). Se puede llevar a cabo una reacción por etapas según los principios de química de péptidos y se puede realizar en un sintetizador de péptidos automatizado. Como sabe el experto en la materia de síntesis de péptidos, se pueden usar aminoácidos diamino tal como lisina u ornitina para construir estructuras ramificadas. Por tanto, se puede proporcionar una gran variedad de homopolímeros lineales y

ramificados, pero también de heteropolímeros que comprenden diferentes oligo(alquilenamina)s de fórmula (I) en posiciones deseadas del polímero. Además, se pueden incorporar aminoácidos canónicos en tales estructuras definidas en cualquier posición.

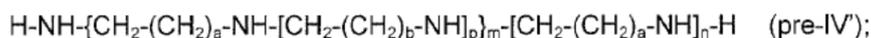
5 Para la preparación de los lipidoides de fórmula (IV), y formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IVa), (IVb) y (IVc), se pueden emplear métodos que son análogos a los descritos en el documento US 2010/0331234 A1, documento US 8.450.298; Love et al. 2010, PNAS 107, 1864-1869; documento WO2006/138380; Akinc et al. 2008, Nat Biotechnol 26, 561-569.

10 Por ejemplo, los lipidoides de fórmula (IV), y formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IVa), (IVb) y (IVc) se pueden derivar haciendo reaccionar R<sup>7</sup>-epóxido o R<sup>7</sup>-O-(C=O)-CH=CH<sub>2</sub> o R<sup>7</sup>-NH-(C=O)-CH=CH<sub>2</sub> o R<sup>7</sup>-(C=O)-H con una oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV)

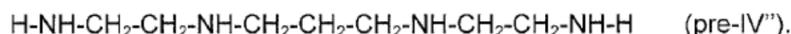


15 en donde a, b, p, m, n se definen como en la fórmula (IV) y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> son independientemente entre sí hidrógeno o un grupo protector para un grupo amino y R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C. Preferiblemente R<sup>7</sup> es alquilo o alqueno de C8-C16, más preferiblemente alquilo o alqueno de C8-C12 y lo más preferido alquilo o alqueno de C10-C12. Ventajosamente, numerosos compuestos alifáticos terminados en un extremo con un epóxido, un acrilato, una acrilamida o un aldehído están comercialmente disponibles.

20 Preferiblemente, el lipidoide de fórmula (IV) se prepara a partir de la oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV')

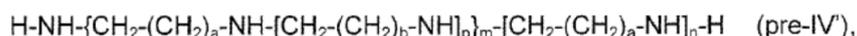


25 Más preferiblemente, los precursores de fórmula (pre-IV) tienen cuatro o más grupos amino. Lo más preferiblemente, el lipidoide de fórmula (IV) se prepara a partir de la oligo(alquilenamina) (pre-IV'')



30 La reacción se puede llevar a cabo con o sin solvente a temperatura elevada entre 50°C y 90°C. Los solventes adecuados son, por ejemplo, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>, metanol, etanol, THF, hexanos, tolueno, benceno, etc.

35 Un experto en la materia sabe que los nitrógenos en una oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV')



se pueden proporcionar con grupos protectores ortogonales tal como se describe, por ejemplo, en el documento WO2006/138380. Un grupo protector en este contexto es adecuado para bloquear temporalmente uno o varios nitrógenos en un compuesto de fórmula (pre-IV') de modo que una reacción se pueda llevar a cabo selectivamente en otros nitrógenos no protegidos con la misma molécula. Después de la reacción, el grupo protector se elimina por una reacción química que no afecta a los otros residuos unidos a átomos de nitrógeno en la misma molécula. Los grupos protectores ortogonales son grupos protectores diferentes que se pueden eliminar selectivamente por reacciones químicas que afectan específicamente a un tipo de grupo protector en una molécula determinada. Por ejemplo, como se describe en los ejemplos, los grupos amino terminales primarios en una oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV')

40 se puede proteger selectivamente con el grupo protector 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) mientras que las aminas secundarias internas se pueden proteger con el grupo protector t-butoxicarbonilo (Boc). El grupo Fmoc se puede eliminar selectivamente por una base, el grupo protector Boc por un ácido. Los intermedios protegidos y parcialmente protegidos se pueden separar por cromatografía. Por tanto, en virtud de un posicionamiento definido y/o eliminación selectiva de grupos protectores ortogonales es posible, por ejemplo, hacer reaccionar selectivamente todos o parte de los grupos amino secundarios internos o todo o partes de las dos valencias de los grupos amino primarios terminales de una oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV') con cadenas alifáticas terminadas en un extremo con un epóxido o un acrilato o una acrilamida. En virtud del mismo principio, es posible acoplar más de una única especie de R<sup>7</sup>-epóxido o R<sup>7</sup>-O-(C=O)-CH=CH<sub>2</sub> o R<sup>7</sup>-NH-(C=O)-CH=CH<sub>2</sub> o R<sup>7</sup>-(C=O)-H a una oligo(alquilenamina) determinada de fórmula (pre-IV')

45 se puede proteger selectivamente con el grupo protector 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) mientras que las aminas secundarias internas se pueden proteger con el grupo protector t-butoxicarbonilo (Boc). El grupo Fmoc se puede eliminar selectivamente por una base, el grupo protector Boc por un ácido. Los intermedios protegidos y parcialmente protegidos se pueden separar por cromatografía. Por tanto, en virtud de un posicionamiento definido y/o eliminación selectiva de grupos protectores ortogonales es posible, por ejemplo, hacer reaccionar selectivamente todos o parte de los grupos amino secundarios internos o todo o partes de las dos valencias de los grupos amino primarios terminales de una oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV') con cadenas alifáticas terminadas en un extremo con un epóxido o un acrilato o una acrilamida. En virtud del mismo principio, es posible acoplar más de una única especie de R<sup>7</sup>-epóxido o R<sup>7</sup>-O-(C=O)-CH=CH<sub>2</sub> o R<sup>7</sup>-NH-(C=O)-CH=CH<sub>2</sub> o R<sup>7</sup>-(C=O)-H a una oligo(alquilenamina) determinada de fórmula (pre-IV')

50 con "especie" refiriéndose a diferentes tipos de residuos R<sup>7</sup> en términos de alquilo o alqueno y en términos de longitud de cadena alifática y al epóxido, acrilato, acrilamida o aldehído terminal. El grado de derivación de la oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV') en tales reacciones se puede controlar por la estequiometría de los reactivos tal como se describe en el estado de la técnica previo. Después de la eliminación de los grupos protectores, las valencias restantes de átomos de nitrógeno se pueden usar para unirse un grupo guanidinio (-C(NH)-NH<sub>2</sub>), una cadena de poli(etilenglicol) o un ligando de receptor. Los lipidoides de fórmula (IV) se pueden purificar por precipitación, extracción o cromatografía. Basado en la opción de que los lipidoides de fórmula (IV) se pueden preparar por reacciones por etapas controladas con la ayuda de grupos protectores y que el grado de derivación de la

60 reacciones por etapas controladas con la ayuda de grupos protectores y que el grado de derivación de la

oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV') se puede controlar por la estequiometría de los reactivos, el lipidoide de la presente divulgación puede contener aminas primarias, secundarias, terciarias y/o cuaternarias, y sales de las mismas. En consecuencia, también los valores de  $pK_a$  de los lipidoide se pueden ajustar por diseño racional del grado de derivación de modo que uno o más átomos de nitrógeno en la fórmula (IV) pueden estar protonados para proporcionar un lipidoide catiónico de fórmula (IV) adecuado para unirse y compactar y proteger ARN. Además, los valores de  $pK_a$  se pueden ajustar de modo que uno o más de los átomos de nitrógeno en la fórmula (IV) puedan tener capacidad tamponante a pH ácido y por tanto pueda ejercer un efecto de esponja de protones tras la absorción endocítica en las células. Preferiblemente, los valores de  $pK_a$  de los lipidoide de fórmula (IV) están entre 3,0 y 9,0, más preferiblemente al menos un valor de  $pK_a$  es entre 5,0 y 8,0.

El número máximo de cadenas laterales alifáticas que se puede acoplar a una oligo(alquilenamina) de fórmula (pre-IV') con el fin de obtener un lipidoide de fórmula (IV) es  $(p + 1) \times m + n + 3$ , el número mínimo es 1, donde p, m y n se definen como en la fórmula (IV). Preferiblemente, el número de cadenas laterales alifáticas es al menos 2 y como mucho  $(p + 1) \times m + n + 2$  si ninguno de los residuos  $R^1$  a  $R^6$  es diferente de hidrógeno o  $CH_2-CH(OH)-R^7$ ,  $-CH(R^7)-CH_2-OH$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-O-R^7$ ,  $-CH_2-CH_2-C(O)-NH-R^7$  o  $-CH_2-R^7$  y preferiblemente el número de cadenas laterales alifáticas es como mucho  $(p + 1) \times m + n + 1$  si uno de los residuos  $R^1$  a  $R^6$  es un grupo protector para un grupo amino o  $-C(NH)-NH_2$  o una cadena de poli(etilenglicol) o un ligando de receptor.

#### Ácido nucleico

La composición de la presente invención comprende un ARN monocatenario tal como ARNm.

El término "ácido nucleico" abarca todas las formas de tipos naturales de ácido nucleicos, así como ácidos nucleicos química y/o enzimáticamente sintetizados y también abarca análogos de ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos tal como, por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (ANB), ácidos peptidonucleicos (APN), oligonucleósidos tiofosfatos y fosfotriésteres, morfolino oligonucleótidos, oligonucleótidos catiónicos (documentos US6017700A, WO/2007/069092), ribooligonucleótidos sustituidos o fosforotioatos. Además, el término "ácido nucleico" también se refiere a cualquier molécula que comprende nucleótidos o análogos de nucleótidos. No hay limitaciones respecto a la secuencia o tamaño de un ácido nucleico comprendido en la composición de la presente invención. El ácido nucleico se define predominantemente por el efecto biológico que se va a lograr en la diana biológica a la que se administra la composición de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de una aplicación en terapia génica o de ácidos nucleicos, el ácido nucleico o secuencia de ácido nucleico se puede definir por el gen o fragmento génico que se va a expresar o por la sustitución o reparación pretendida de un gen defectuoso o cualquier secuencia génica diana o por la secuencia diana de un gen que se va a inhibir, atenuar o disminuir.

Preferiblemente, el término "ácido nucleico" se refiere a oligonucleótidos o polinucleótidos, incluyendo ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Con respecto al ARN, en principio cualquier tipo de ARN se puede emplear en el contexto de la presente divulgación. Según la invención, el ARN es un ARN monocatenario. El término "ARN monocatenario" significa una única cadena consecutiva de ribonucleótidos en contraste con moléculas de ARN en las que dos o más cadenas separadas forman una molécula bicatenaria debido a la hibridación de las cadenas separadas. El término "ARN monocatenario" no excluye que la molécula monocatenaria forme en si misma estructuras bicatenarias tal como bucles, estructuras secundarias o terciarias.

El término "ARN" cubre ARN que codifica una secuencia de aminoácidos, así como ARN que no codifica una secuencia de aminoácidos. Se ha sugerido que más del 80% del genoma contiene elementos de ADN funcionales que no codifican proteínas. Estas secuencias no codificantes incluyen elementos de ADN reguladores (sitios de unión para factores de transcripción, reguladores y correguladores, etc.) y secuencias que codifican transcritos que nunca se traducen a proteínas. Estos transcritos, que están codificados por el genoma y se transcriben a ARN, pero no se traducen a proteínas, se llaman ARN no codificantes (ARNnc). Por tanto, en una forma de realización, el ARN es un ARN no codificante. Preferiblemente, el ARN no codificante es una molécula monocatenaria. Hay estudios que demuestran que los ARNnc son jugadores clave en la regulación génica, mantenimiento de la integridad genómica, diferenciación celular y desarrollo, y están mal regulados en varias enfermedades humanas. Hay diferentes tipos de ARNnc: ARNnc cortos (20-50 nt), medios (50-200 nt), y largos (> 200 nt). Los ARNnc cortos incluyen microARN (miARN), ARN interferente pequeño (ARNip), ARN asociado a piwi (ARNap), y ARN iniciador de la transcripción (ARNit). Los ejemplos de ARNnc medios son ARN nucleares pequeños (ARNnp), ARN nucleolares pequeños (ARNnop), ARN de transferencia (ARNt), ARN asociados con el sitio de inicio de la transcripción (ARNaSIT), ARN pequeños asociados con el promotor (PASR) y transcritos anteriores al promotor (PROMPT). Los ARN no codificantes largos (ARNlnc) incluyen ARN largos no codificantes intergénico (ARNlnci), ARNlnc antisentido, ARNlnc intrónico, ARN transcritos ultraconservados (T-UCR), y otros (Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 26 Mar. 2014 doi: 10.1002/cmdc.201300534). De los ARN no codificantes anteriormente mencionados solo el ARNip es bicatenario. Por tanto, puesto que en una forma de realización preferida el ARN no codificante es monocatenario, se prefiere que el ARN no codificante no sea ARNip. En otra forma de realización el ARN es un ARN codificante, es decir, un ARN que codifica una secuencia de aminoácidos. Tales moléculas de ARN también se denominan ARNm (ARN mensajero) y son moléculas de ARN monocatenario. Los ácidos nucleicos se pueden hacer por metodología sintética química y enzimática que conoce un experto en la materia, o mediante el uso de tecnología recombinante, o se pueden aislar de fuentes naturales, o mediante una combinación de las mismas. Los oligo- o polinucleótidos pueden comprender

opcionalmente nucleótidos no naturales y pueden ser mono o bi o tricatenarios. "Ácido nucleico" también se refiere a oligo- y polinucleótidos sentido y antisentido, es decir, una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos específica en un ADN y/o ARN.

5 Preferiblemente, el término ácido nucleico se refiere a ARNm y lo más preferiblemente a ARNm modificado.

Los ARN mensajeros (ARNm) son polímeros que están contruidos de elementos básicos de nucleósido fosfato principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos, que como portadores intermedios llevan la información genética del ADN en el núcleo de la célula al citoplasma, donde se traduce a proteínas. Por tanto, son  
10 adecuados como alternativa para expresión génica.

En el contexto de la presente invención, se debe entender que ARNm significa cualquier molécula de polirribonucleótido que, si entra en la célula, es adecuada para la expresión de una proteína o fragmento de la misma o es traducible a una proteína o fragmento de la misma. El término "proteína" aquí abarca cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos que se unen cada uno mediante enlaces peptídicos y  
15 también incluye péptidos y proteínas de fusión.

El ARNm contiene una secuencia de ribonucleótidos que codifica una proteína o fragmento de la misma cuya función en la célula o en la vecindad de la célula es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, una proteína cuya falta o forma defectuosa es un desencadenante para una enfermedad o una dolencia, cuya provisión puede moderar o prevenir una enfermedad o una dolencia, o una proteína que puede fomentar un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o su vecindad. El ARNm puede contener la secuencia para la proteína completa o una variante funcional de la misma. Además, la secuencia de ribonucleótidos puede codificar una proteína que actúe como un factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional de la misma, donde esta proteína es una cuya función es necesaria con el fin de remediar un trastorno, en particular un trastorno metabólico o con el fin de iniciar procesos in vivo tal como la formación de nuevos vasos sanguíneos, tejidos, etc. Aquí, se entiende que variante funcional significa un fragmento que en la célula puede emprender la función de la proteína cuya función en la célula es necesaria o cuya falta o forma defectuosa es patógena. Además, el ARNm también puede tener regiones funcionales adicionales y/o  
20 regiones no codificantes 3' o 5'. Las regiones no codificantes 3' y/o 5' pueden ser regiones que flanquean de forma natural la secuencia codificante de proteína o secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización del ARN. Los expertos en la materia pueden determinar las secuencias adecuadas para esto en cada caso por experimentos rutinarios.

En una forma de realización preferida, el ARNm contiene un casquete m7GpppG, un sitio de entrada interna al ribosoma (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 3' en particular con el fin de mejorar la traducción. El ARNm puede tener más regiones que fomentan la traducción.  
35

En una forma de realización el ARNm es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y sin modificar. Preferiblemente, es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y sin modificar como se describe en el documento WO2011/012316. El ARNm descrito en el mismo se describe que muestra una estabilidad aumentada e inmunogenicidad disminuida. En una forma de realización preferida, en tal ARNm modificado, del 5 al 50% de los nucleótidos de citidina y del 5 al 50% de los nucleótidos de uridina están modificados. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanosina pueden estar sin modificar. Los nucleótidos de adenosina y guanosina pueden estar sin modificar o parcialmente modificados, y preferiblemente están presentes en una forma sin  
40 modificar. Preferiblemente del 10 al 35% de los nucleótidos de citidina y uridina están modificados y en particular preferiblemente el contenido de los nucleótidos de citidina modificados está en el intervalo del 7,5 al 25% y el contenido de los nucleótidos de uridina modificados en un intervalo del 7,5 al 25%. Se ha encontrado que de hecho un contenido relativamente bajo, por ejemplo, solo del 10% de cada uno, de nucleótidos de citidina y uridina modificados puede lograr las propiedades deseadas. Es particularmente preferido que los nucleótidos de citidina modificados sean residuos de 5-metilcitidina y los nucleótidos de uridina modificados sean residuos de 2-tiouridina. Lo más preferiblemente, el contenido de nucleótidos de citidina modificados y el contenido de nucleótidos de uridina modificados es del 25%, respectivamente.  
45  
50

En otra forma de realización preferida, el ARNm se puede combinar con sitios de unión diana, secuencias de direccionamiento y/o con sitios de unión de micro-ARN, con el fin de permitir la actividad del ARNm deseado solo en las células relevantes. En una forma de realización más preferida, el ARN se puede combinar con micro-ARN o ARNhc después de la cola de poliA en 3'.  
55

Además, el término "ácido(s) nucleico(s)" se puede referir a ADN o ARN o híbridos de los mismos o cualquier modificación de los mismos que sea conocida en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, los documentos US 8278036, WO 2013/052523, WO 2011/012316, US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175, (Lorenz et al. 2004, Bioorg Med Chem Lett, 14, 4975-4977; Soutschek et al. 2004, Nature, 432, 173-178) para ejemplos de modificaciones). Tales molécula(s) de ácido nucleico son mono- o bicatenarias, lineales o circulares, naturales o sintéticas, y sin ninguna limitación de tamaño. Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN antisentido, ribozima o ARN interferentes pequeños (ARNip), micro-ARN, antagonismos, o ARN horquillados cortos (ARNhc), ARNt o ARN bicatenarios largos o una construcción de ADN que codifica tales  
60  
65

ARN o quimeroplastos (Colestraus et al. 1996, Science, 273, 1386-1389), o aptámeros, repeticiones palindrómicas cortas regularmente espaciadas agrupadas ("CRISPR" para corte de ADN específico de sitio guiado por ARN) (Cong et al. 2013, Science, 339, 819-823), o ARN y ADN. Dicha(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden estar en forma de plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, ADN o ARN vírico, ADN de bacteriófago, ARN codificante y no codificante monocatenario (ARNm) o bicatenario y oligonucleótido(s), en donde se incluyen cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica en el esqueleto de azúcar y/o en las bases como se ha descrito anteriormente y modificaciones en 3' o 5'. En una forma de realización particularmente preferida el ácido nucleico es ARN, más preferiblemente ARNm o ARNip.

Los ácido(s) nucleico(s) puede(n) contener una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se va a expresar en una célula diana. Se pueden usar métodos que conocen bien los expertos en la materia para construir moléculas recombinantes de ácido nucleico; véase, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y. y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

En una forma de realización preferida, dicho ácido nucleico es un ácido nucleico terapéutica o farmacéuticamente activo incluyendo todos los tipos de ácidos nucleicos y modificaciones enumerados anteriormente y las que conocen los expertos en la materia que pueden tener efecto terapéutico o preventivo. En general, los efectos terapéuticos o preventivos se pueden lograr por la interacción del ácido nucleico con moléculas y orgánulos celulares. Tal interacción sola puede, por ejemplo, activar el sistema inmunitario innato, como en el caso de ciertos oligonucleótidos CpG y secuencias diseñadas para interaccionar específicamente con receptores de tipo toll y otros extra o intracelulares. Además, se puede pretender que la absorción o introducción de ácidos nucleicos en células lleve a la expresión de secuencias de nucleótidos tal como genes comprendidos en el ácido nucleico, se puede pretender la disminución, silenciamiento o atenuación de expresión génica endógena como consecuencia de la presencia intracelular de un ácido nucleico exógeno introducido, o se puede pretender para la modificación de secuencias de ácido nucleico endógenas tal como reparación, escisión, inserción o intercambio de bases seleccionadas o de tramos enteros de secuencias de ácido nucleicos endógenas, o se puede pretender para interferencia con virtualmente cualquier proceso celular como consecuencia de la presencia intracelular e interacción de un ácido nucleico exógeno introducido. La sobreexpresión de los ácidos nucleicos exógenos introducidos se puede pretender para compensar o complementar la expresión génica endógena, en particular, en casos donde un gen endógeno es defectuoso o silencioso, lo que produce un producto ausente, insuficiente o defectuoso o disfuncional de expresión génica tal como es el caso con muchas enfermedades metabólicas o hereditarias, como fibrosis quística, hemofilia o distrofia muscular por nombrar unas pocas. La sobreexpresión de los ácidos nucleicos exógenos introducidos también se puede pretender para hacer que el producto de la expresión interaccione o interfiera con cualquier proceso celular endógeno tal como la regulación de la expresión génica, transducción de señales y otros procesos celulares. La sobreexpresión de los ácidos nucleicos exógenos introducidos también se puede pretender para dar lugar a respuesta inmunitaria en el contexto del organismo en que reside una célula transfectada o transducida o se hace que resida. Los ejemplos son la modificación genética de células presentadoras de antígeno tal como células dendríticas con el fin de que presenten un antígeno para fines de vacunación. Otros ejemplos son la sobreexpresión de citoquinas en tumores con el fin de provocar una respuesta inmunitaria específica de tumor. Además, la sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también se puede pretender para generar células genéticamente modificadas transitoriamente in vivo o ex vivo para terapias celulares tal como células T modificadas o células precursoras o madre u otras para medicina regenerativa.

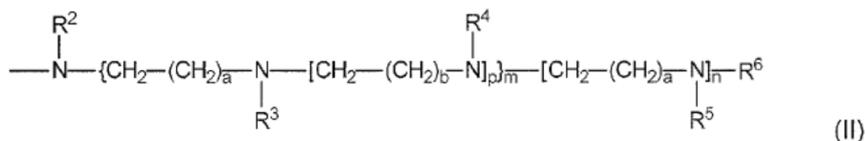
La disminución, silenciamiento o atenuación de expresión génica endógena para fines terapéuticos se puede, por ejemplo, lograr por interferencia de ARN (iARN), con ribozimas, oligonucleótidos antisentido, ARNt, ARN bicatenario largo donde tal disminución puede ser específica de secuencia o inespecífica y también puede producir muerte celular como es el caso cuando se introducen ARN bicatenarios largos en células. La disminución, silenciamiento o atenuación de expresión génica endógena o preexistente puede ser útil en el tratamiento de enfermedades adquiridas, hereditarias o espontáneamente contraídas incluyendo infecciones víricas y cáncer. También se puede prever que la introducción de ácidos nucleicos en células se pueda practicar como una medida preventiva con el fin de prevenir, por ejemplo, infección vírica o neoplasias. La disminución, silenciamiento o atenuación de expresión génica endógena se puede ejercer a nivel transcripcional y a nivel de traducción. El experto en la materia conoce múltiples mecanismos e incluyen, por ejemplo, modificaciones epigenéticas, cambios en la estructura de la cromatina, unión selectiva de factores de transcripción por el ácido nucleico introducido, hibridación del ácido nucleico introducido a secuencias complementarias en el ADN genómico, ARNm u otras especies de ARN por apareamiento de bases incluyendo mecanismos de apareamiento de bases no convencional tal como formación de hélice triple. De forma similar, se puede lograr reparación de genes, cambios de base o secuencia a nivel genómico y a nivel de ARNm incluyendo salto de exones. Los cambios de base o secuencia se pueden lograr, por ejemplo, por corte de ADN específico de sitio guiado por ARN, por mecanismos de cortar y pegar que explotan trans-ayuste, ribozimas de trans-ayuste, quimeroplastos, trans-ayuste de ARN mediado por espliceosoma, o explotando intrones de grupo II o redirigidos, o explotando mutagénesis insercional mediada por virus o explotando inserción genómica dirigida usando sistemas de integrasa procariontes, eucariotes o víricos. Como los ácidos nucleicos son los portadores de los planes de construcción de sistemas vivos y como participan en muchos procesos celulares de una manera directa e indirecta, en teoría se puede influir cualquier proceso celular mediante la introducción de ácidos nucleicos en células desde el exterior. Notablemente, esta introducción se puede llevar a cabo directamente in vivo y ex vivo en cultivo de células u órganos

seguido por el trasplante de los órganos y células así modificados a un receptor. Los complejos de la presente invención con ácidos nucleicos como agentes activos pueden ser útiles para todos los fines descritos anteriormente.

*Composición*

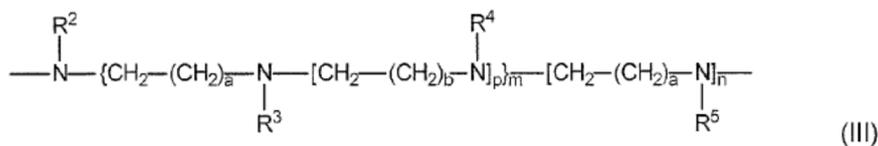
5 Como se ha divulgado anteriormente, la composición según la invención comprende el ácido nucleico y el componente que comprende una oligo(alquilenamina) componente que se selecciona de:

10 a) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal:



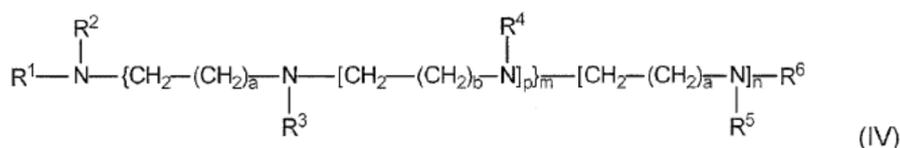
15 en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como anteriormente, incluyendo las formas de realización preferidas, y en particular los grupos preferidos de fórmulas (IIa)-(IIc); y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II);

b) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas:



20 en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como anteriormente, incluyendo las formas de realización preferidas, y en particular los grupos preferidos de fórmulas (IIIa)-(IIIc); y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III);

c) un lipidoide que tiene la estructura de fórmula (IV):



30 en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como anteriormente, incluyendo las formas de realización preferidas, y en particular los grupos preferidos de fórmulas (IVa)-(IVc); y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IV) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (IV).

35 La invención abarca también una composición que consiste en el ARN monocatenario tal como ARNm, y el componente que comprende una oligo(alquilenamina) seleccionada de los componentes a) a c) como se define en el presente documento, incluyendo las formas de realización preferidas de los mismos. Sin embargo, la composición también puede comprender componentes adicionales, por ejemplo, componentes para formulación lipídica y/o componentes que ejercen una función efectora durante la administración del ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, a y en una célula.

45 Se entenderá que la composición según la invención en general proporciona una asociación de ARN monocatenario tal como ARNm con un oligómero, polímero o lipidoide y componentes opcionales adicionales que se asocian en una entidad finita, suficientemente estable para mantener la asociación de una proporción significativa de dichos componentes hasta que alcancen una diana biológica o los alrededores de una diana biológica durante una aplicación, por ejemplo, durante una ruta deseada de administración de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm.

50 Debido a la presencia de los grupos amino protonables en los oligómeros, polímeros o lipidoide según la divulgación, estos oligómeros, polímeros o lipidoide pueden comprender cargas catiónicas en los grupos de fórmula (II) o (III) o en la estructura de fórmula (IV), de modo que los oligómeros, polímeros o lipidoide forman cationes, típicamente oligo- o policationes que contienen una pluralidad de fracciones catiónicas, en presencia de protones, por ejemplo, en

agua o soluciones acuosas, o en presencia de un ácido donante de protones. Por tanto, preferiblemente, la composición según la invención contiene o consiste en un complejo de ARN monocatenario tal como ARNm, y un oligómero, polímero o lipidoide catiónico según la divulgación. Se entenderá que un oligómero, polímero o lipidoide catiónico y un ácido nucleico aniónico en general se asocian a través de interacción electrostática en tal complejo. Sin embargo, dependiendo de la estructura específica del oligómero, polímero o lipidoide y el ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, otras interacciones atractivas también pueden participar en estabilizar el complejo, incluyendo enlaces de hidrógeno y enlaces covalentes.

En las composiciones de la presente invención, el oligómero, polímero o lipidoide y el ARN monocatenario tal como ARNm, pueden estar contenidos, por ejemplo, en una proporción peso de oligómero, polímero o lipidoide/peso de ácido nucleico (p/p) de 0,25/1-50/1, preferiblemente de 0,5/1-30/1, más preferiblemente de 1/1-20/1.

Más preferiblemente, en casos en donde la composición contiene un complejo del ARN monocatenario tal como ARNm, y un oligómero, polímero o lipidoide catiónico según la divulgación, las proporciones relativas del oligómero, polímero o lipidoide y el ARN monocatenario tal como ARNm, en las composiciones de la invención se pueden seleccionar considerando el grado de neutralización de carga mutua. En la administración de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, con complejos de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm con un oligómero, polímero o lipidoide catiónico, en general, cantidades del oligómero, polímero o lipidoide catiónico se mezclan con una cantidad determinada de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, lo que produce al menos una neutralización de carga de las cargas negativas del ARN, preferiblemente a una sobrecompensación de las cargas negativas del ARN.

Las proporciones adecuadas entre oligómero, polímero o lipidoide catiónico y los ARN se pueden determinar fácilmente por ensayos de retraso en gel, métodos de extinción de fluorescencia tal como el ensayo de desplazamiento/extinción de bromuro de etidio, por medidas del tamaño de partícula y del potencial zeta. Las proporciones útiles entre oligómero, polímero o lipidoide catiónico y ARN habitualmente se caracterizan por al menos retraso parcial, preferiblemente completo, del ARN comprendido en el complejo con el oligómero, polímero o lipidoide catiónico cuando se somete a electroforesis en gel de agarosa, por un alto grado de extinción de fluorescencia de colorantes tal como bromuro de etidio, RiboGreen, o YOYO cuando están intercalados en los ARN o por la formación de (nano)partículas tras mezclar oligómero, polímero o lipidoide y ARN. Para cationes químicamente bien definidos, la proporción N/P calculada es un factor adecuado para elegir y definir las proporciones relativas del oligómero, polímero o lipidoide y el ARN. La proporción N/P designa la proporción molar de los átomos de nitrógeno protonables en los grupos de fórmula (II) (o formas de realización preferidas de la misma), en los grupos de fórmula (III) (o formas de realización preferidas de la misma) o en la estructura de fórmula (IV) (o formas de realización preferidas de la misma) del oligómero, polímero o lipidoide de la presente divulgación sobre los grupos fosfato del ARN en la composición de la presente invención. La proporción N/P es un parámetro establecido para la caracterización de tales complejos de ARN con vehículos catiónicos, y el lector experto entenderá que, por ejemplo, los átomos de nitrógeno en enlaces amida no cuentan como átomos de nitrógeno protonables. En el caso de un oligómero o polímero catiónico, la proporción N/P se puede calcular convenientemente, por ejemplo, según la fórmula

$$\frac{N}{P} = \frac{w_p \times n}{M_{wp}} + \frac{w_{na}}{M_{base}}$$

donde  $w_p$  es el peso molecular del oligómero o polímero,  $n$  es el número de grupos amino protonables por unidad repetitiva,  $M_{wp}$  es el peso molecular de la unidad repetitiva (incluyendo contraiones),  $w_{na}$  es el peso del ARN y  $M_{base}$  es el peso molecular medio de un nucleótido en el ARN que es 346 en el caso de ARN. En complejos binarios policatión/ARN para administración de ARN según la invención, se deben usar preferiblemente cantidades relativas del oligómero, polímero o lipidoide respecto al ARN que proporcionen una proporción N/P que produzca un potencial zeta positivo de la composición binaria final. Para una composición que comprende un lipidoide de fórmula (IV) y un ARN, la proporción N/P se puede calcular convenientemente considerando el número de átomos de nitrógeno protonables en el lipidoide y el número de moles del lipidoide usado en la composición. En el contexto de la presente invención, para composiciones binarias de la presente invención, proporciones N/P de 1 a 100 son preferidas, son más preferidas proporciones N/P de 3 a 60, y las más preferidas son proporciones N/P de 4 a 44.

La composición según la invención opcionalmente comprende componentes adicionales para formulación lipídica. Por ejemplo, la composición que comprende un lipidoide de fórmula (IV) o las formas de realización preferidas de la misma, incluyendo las fórmulas (IVa) a (IVc), comprende lípidos adicionales tal como colesterol, DOPE, DOPC o DSPC que se denominan lípidos auxiliares en la bibliografía científica y/o lípidos PEGilados o cualquier otro lípido útil para preparar lipoplejos. Los lípidos auxiliares preferidos en el contexto de la presente invención son colesterol, DOPE, DOPC y DSPC. En ciertas formas de realización la composición que contiene un lipidoide es aproximadamente el 40-60% de lipidoide, aproximadamente el 40-60% de colesterol, y aproximadamente el 5-20% de PEG-lípido (en porcentaje en peso, basado en el peso total de la composición). En ciertas formas de realización la composición que contiene un lipidoide es aproximadamente el 50-60% de lipidoide, aproximadamente el 40-50% de colesterol, y aproximadamente el 5-10% de PEG-lípido. En ciertas formas de realización la composición que contiene un lipidoide

es aproximadamente el 50-75% de lipidoide, aproximadamente el 20-40% de colesterol, y aproximadamente el 1-10% de PEG-lípido. En ciertas formas de realización la composición que contiene un lipidoide es aproximadamente el 60-70% de lipidoide, aproximadamente el 25-35% de colesterol, y aproximadamente el 5-10% de PEG-lípido. La composición se puede proporcionar por cualquier medio conocido en la técnica (por ejemplo, como se describe en Akinc et al, 2007, Nat Biotech, 26, 561-569; Akinc et al, 2009, Mol Ther, 17, 872-9; Love et al, 2010, PNAS, 107, 1864-9; documentos US 8.450.298, WO2006/138380). Los complejos ARN/lipidoide pueden formar partículas que son útiles en la administración de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, en las células. Se pueden asociar múltiples moléculas de lipidoide con una molécula de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm. Por ejemplo, un complejo puede incluir 1-100 moléculas de lipidoide, 1-1.000 moléculas de lipidoide, 10-1.000 moléculas de lipidoide, o 100-10.000 moléculas de lipidoide. El complejo de ARN(m) y lipidoide puede formar una partícula. El diámetro de las partículas puede variar, por ejemplo, de 10-1.200 nm, más preferiblemente el diámetro de las partículas varía de 10-500 nm, y lo más preferiblemente de 20-150 nm.

La composición de la invención opcionalmente comprende componentes que ejercen una función efectora durante la administración de ARN monocatenario tal como ARNm a y dentro de una célula. Tales componentes pueden ser, pero no están limitados a, polianiones, lípidos como se ha descrito anteriormente, policationes diferentes de los oligómeros, polímeros o dendrímeros de la presente incluyendo péptidos catiónicos, oligómeros o polímeros protectores, poloxámeros (también conocidos como plurónicos), poloxaminas, ligandos de direccionamiento, agentes endosomolíticos, péptidos penetradores de células y señal, nanopartículas magnéticas y no magnéticas, inhibidores de RNasa, colorantes fluorescentes, radioisótopos o agentes de contraste para imagenología médica. El término "función efectora" abarca cualquier función que apoya alcanzar un efecto biológico pretendido de un ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, de la composición en o dentro de una diana biológica o los alrededores de una diana biológica. Por ejemplo, se han formulado composiciones para la administración de ácido nucleico para que comprenden ácidos nucleicos no codificantes o polianiones no ácidos nucleicos como materiales de relleno (Kichler et al. 2005, J Gene Med, 7, 1459-1467). Tales materiales de relleno son adecuados para reducir la dosis de un ácido nucleico que tiene un efecto biológico pretendido mientras se mantiene el nivel o grado de ese efecto obtenido a una dosis mayor de ácido nucleico en ausencia de tal material de relleno. También se han usado polianiones no ácidos nucleicos para obtener expresión génica in vivo prolongada a toxicidad reducida (Uchida et al. 2011, J Control Release, 155, 296-302). Las composiciones de la presente invención también pueden comprender lípidos catiónicos, aniónicos o neutros tal como en el caso de lipopoliplexos (Li y Huang en "Nonviral Vectors for Gene Therapy", Academic Press 1999, Capítulo 13, 295-303). Los lipopoliplexos se pueden preparar ventajosamente a partir de polímeros correspondientes a las fórmulas (II) y (III) de la presente divulgación con lipidoide correspondientes a la fórmula (IV) de la presente divulgación.

Además, las composiciones de la presente invención pueden comprender oligo- o policationes diferentes de los oligómeros, polímeros o lipidoide catiónicos que comprenden poli(aminoalquileno) de la presente divulgación. Tales policationes adicionales pueden ser útiles para alcanzar un grado deseado de compactación de un ácido nucleico o en el caso de péptidos policationes pueden tener una función de señal de localización nuclear tal como se ha descrito previamente (Ritter et al. 2003, J Mol Med, 81, 708-717). También pueden estar comprendidos polímeros protectores tal como poli(etilenglicol) (PEG) en las composiciones de la presente invención y se usan con frecuencia para estabilizar poliplexos y lipoplejos frente a agregación y/o interacciones indeseadas en un entorno biológico (opsonización), por ejemplo, interacciones con componentes del suero, células sanguíneas o matriz extracelular. La protección también puede ser adecuada para reducir la toxicidad de composiciones que comprenden ácidos nucleicos (Finsinger et al. 2000, Gene Ther, 7, 1183-1192). Los polímeros de protección tal como PEG se puede acoplar de forma covalente directamente a polímeros o lipidoide de la presente divulgación.

El acoplamiento se puede lograr en el esqueleto del polímero, preferiblemente, si es factible, en los extremos terminales de un esqueleto de polímero o un dendrímero. Sin embargo, el acoplamiento también se puede lograr a los grupos amino de las fórmulas (II), (III) y (IV).

Se ha encontrado que derivados de polivinilo tal como PVP y poloxámeros son útiles para aumentar la transfección tras inyección intramuscular (Mumper et al. 1996, Pharm Res, 13, 701-709, Lemieux et al. 2000, Gene Ther, 7, 986-991) y, por tanto, puede ser útil que estén comprendidos en las composiciones de la presente invención.

Los ligandos de direccionamiento incluyendo anticuerpos comprendidos en las composiciones para administrar ácidos nucleicos son útiles para transfección preferente y mejorada de células diana (Philipp y Wagner en "Gene and Cell Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3ª Edición, Capítulo 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009). Un ligando de direccionamiento puede ser cualquier compuesto que confiera a las composiciones de la presente invención una función de reconocimiento de diana y/o de unión a diana de una manera directa o indirecta. En términos lo más generales, una diana es una estructura biológica distinta a la que el ligando de direccionamiento se puede unir específicamente a través de interacción molecular y donde tal unión llevará con el tiempo a la acumulación preferente del ácido nucleico comprendido en la composición en un tejido diana y/o en o dentro de una célula diana. De forma similar a las cadenas de PEG, los ligandos de direccionamiento se pueden acoplar de los extremos terminales de un esqueleto de polímero o un dendrímero. Sin embargo, el acoplamiento también se puede lograr a los grupos de fórmulas (II), (III) y (IV).

Además, agentes endosomolíticos tal como péptidos endosomolíticos (Plank et al. 1998, *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 21-35) o cualquier otro compuesto que sea adecuado para aumentar la liberación endosómica de un ácido nucleico endocitosado son componentes útiles de las composiciones de la presente invención. De forma similar, los péptidos penetradores de células (en otro contexto también conocidos como dominios de transducción de proteínas) (Lindgren et al. 2000, *Trends Pharmacol Sci*, 21, 99-103) pueden ser componentes útiles de la composición de la presente invención con el fin de mediar administración intracelular de un ácido nucleico. El llamado péptido TAT está dentro de esta clase y también tiene función de localización nuclear (Rudolph et al. 2003, *J Biol Chem*, 278, 11411-11418).

Las nanopartículas magnéticas que pueden estar comprendidas en las composiciones de la presente invención son útiles para el direccionamiento físico de la administración por fuerza magnética y para un aumento drástico de la eficacia de la transferencia de ácido nucleico, un mecanismo también conocido como magnetofección (documento EP1297169; Plank et al. 2011, *Adv Drug Deliv Rev*, 63, 1300-1331). De forma similar, una composición de la presente invención también puede ser una microburbuja no magnética o magnética usada para la mejora y el direccionamiento físico de administración de ácidos nucleicos mediante ultrasonido y opcionalmente aplicación de campo magnético (Holzbach et al. 2010, *J Cell Mol Med*, 14, 587-599, Vlaskou et al. 2010, *Adv Funct Mater*, 20, 3881-3894). Puntos cuánticos (Zintchenko et al. 2009, *Mol Ther*, 17, 1849-1856), marcadores radioactivos y agentes de contraste para imagenología médica se pueden usar ventajosamente para seguir la administración de ácidos nucleicos y para determinar la biodistribución de composiciones para administración de ácidos nucleicos. En resumen, se han descrito numerosos efectores para la administración de ácidos nucleicos y pueden ser componentes útiles en las composiciones que comprenden un ácido nucleico y un oligómero o polímero o dendrímero según la invención.

Los expertos en la materia saben bien que hay un gran grado de flexibilidad con respecto a la cantidad de sustancia de cada componente comprendido en la composición según la presente invención. Por ejemplo, los denominados poliplejos binarios monomoleculares se han descrito para ADN de plásmido donde la composición consiste en nanopartículas formadas tras la mezcla del polication y el ADN de plásmido que comprende exactamente una única molécula de ADN de plásmido y tantas moléculas de polication que se requieren para neutralización de carga o sobrecompensación de carga (positiva o negativa) (DeRouchey et al. 2006, *J Phys Chem B*, 110(10):4548-54). Para complejos PEI-ADN a proporciones N/P que con frecuencia se usan en transfecciones se encontró por espectroscopía de correlación de fluorescencia que contenían de media 3,5 (+/- 1) moléculas de plásmido de ADN y 30 moléculas de PEI mientras que aproximadamente el 86% de las moléculas de PEI usadas para preparar los complejos estaban en forma libre (Clamme et al. 2003, *Biophys J* 84, 1960-1968). En el otro extremo, se encontró que complejos agregados de PEI y ADN de plásmido, que comprendían putativamente un gran número (de decenas a cientos) de moléculas de componente rendían mejor en transfección que nanopartículas PEI-ADN pequeñas discretas (Ogris et al. 1998, *Gene Ther*, 5, 1425-1433; Ogris et al. 2001, *AAPS PharmSci*, 3, E21). Por tanto, la composición según la presente invención puede ser una (nano)partícula que comprende unas pocas moléculas de ARN monocatenario tal como ARNm, pero también puede ser un objeto macroscópico tal como un precipitado o un polvo seco que comprende números enormes de moléculas de ARN monocatenario tal como ARNm. En resumen, las composiciones de la presente invención se caracterizan por las proporciones de aporte de sus componentes antes del autoensamblaje. Las proporciones p/p de aporte típicas de componentes individuales relativos al componente de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm son entre 1 y 50. la proporción N/P es una medida adecuada de la proporción de aporte para composiciones binarias polímero/dendrímero o lipidoide cuando el oligómero o polímero/dendrímero o lipidoide está químicamente bien definido. Si la composición de la presente invención comprende componentes adicionales, una asignación de una proporción N/P puede ser ambigua. En este caso, se determinan proporciones de aporte adecuadas por experimento incluyendo, pero no limitado a, ensayos de retraso en gel, ensayos de extinción de fluorescencia tal como los ensayos de desplazamiento/extinción de bromuro de etidio, por medidas de tamaño de partículas y potencial zeta y por ensayos funcionales tal como ensayos de transfección como se describe en el presente documento. En complejos ternarios que comprenden un polianión adicional o polímeros protectores, la proporción de carga neta (positiva sobre negativa) puede ser menor que 1 y el potencial zeta puede ser neutro o negativo.

La composición de la invención se puede producir como se describe a continuación. Después del proceso de autoensamblaje, la composición de la presente invención se puede separar de cualquier componente no incorporado y en la misma etapa el medio de suspensión se puede sustituir por centrifugación o por ultrafiltración o cromatografía de exclusión molecular o diálisis o cualquier método relacionado. La estequiometría de los componentes de la composición de la presente invención, purificados o sin purificar, se puede determinar por una variedad de métodos analíticos incluyendo métodos espectroscópicos tal como espectrometría UV/VIS o espectroscopía de correlación de fluorescencia (DeRouchey et al. 2006, *J Phys Chem B*, 110(10):4548-54), por marcaje ortogonal de fluorescencia o radioisótopo de los componentes individuales, por espectroscopia de RMN e IR o análisis cromatográfico y cuantificación tras el desmontaje de la composición. El desmontaje se puede lograr, por ejemplo, por la adición de exceso de polianión tal como heparina como se describe en el presente documento o sulfato de condroitina o por la adición de dodecilsulfato de sodio.

La presente invención también se refiere a un método para producir la composición de la invención. Los oligómeros, polímeros o lipidoide de la presente divulgación se pueden producir y purificar como se describe en el presente documento. Los oligómeros, polímeros o lipidoide se pueden almacenar en solución acuosa o como polvo seco en cuyo caso se redisuelven en medio acuoso, preferiblemente agua, antes de producir la composición. El pH de la solución se ajusta a neutro o ligeramente ácido (hasta pH 4,5) con ácido, preferiblemente con ácido clorhídrico o

cítrico, si se requiere. En el caso de que ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, sea el ácido nucleico comprendido en la composición se prefiere que el pH se ajuste a aproximadamente 4,5 a 5,5, preferiblemente de aproximadamente 4,9 a 5,1, más preferiblemente a aproximadamente 5,0. Los ácidos nucleicos se producen y purifican según el estado de la técnica que conoce bien el experto en la materia. El ácido nucleico se proporciona como solución en medio acuoso, preferiblemente agua. Opcionalmente, o bien el oligómero, polímero o lipidoide, o bien el ácido nucleico o ambos están químicamente unidos con moléculas efectoras tal como ligandos de direccionamiento, péptidos señal, péptidos de penetración de células, sustancias endosomolíticas o polímeros protectores. Sin embargo, dependiendo de la naturaleza química de las moléculas efectoras, pueden no necesitar estar unidas por enlace químico, sino que más bien se pueden incorporar en la composición de la presente invención por autoensamblaje basado en unión no covalente, es decir, interacción electrostática, hidrofóbica o de van der Waals con cualquiera de los otros componentes de la composición. Para este fin, puede ser ventajoso ajustar la fuerza iónica, el tipo de contraión, el pH o el contenido en solvente orgánico de las soluciones de componentes individuales.

Se pueden usar solventes orgánicos para preparar soluciones madre de los lipidoide de fórmula (IV) y se pueden requerir para el coensamblaje de componentes adicionales débilmente o no solubles en agua tal como lípidos u oligómeros o polímeros hidrofóbicos. Los solventes orgánicos adecuados son, por ejemplo, solventes miscibles con agua tal como etanol y otros alcoholes, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, N-metilpirrolidona, o glicofurol y otros solventes descritos en el documento WO2013/045455. En una forma de realización, las composiciones que comprenden lipidoide de la presente invención se preparan a partir de lipidoide y componentes adicionales tal como lípidos auxiliares disueltos en cualquiera de estos solventes, preferiblemente etanol, y ARN monocatenario tal como ARNm disuelto en medio acuoso, preferiblemente tamponado a pH ácido. En una primera etapa, los componentes disueltos en la fase orgánica se mezclan en la proporción estequiométrica deseada y se diluyen a un volumen final deseado con el solvente orgánico de elección. Una cantidad del ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, correspondiente a la proporción final deseada con respecto al lipidoide se diluye en el medio acuoso. Preferiblemente, el volumen del medio acuoso es al menos igual al volumen de las soluciones de componentes combinadas en solvente orgánico. Preferiblemente, el volumen de la fase acuosa que comprende el ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm supera el volumen de las soluciones de componentes combinados en solvente orgánico, lo más preferiblemente, la proporción v/v de fase acuosa y orgánica es 4:1. En la segunda etapa, la mezcla orgánica que comprende el lipidoide se inyecta rápidamente en la solución acuosa del ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, preferiblemente mientras se agita con el vórtex. Opcionalmente, las soluciones de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y componentes que comprenden lipidoide se calientan antes o después de esta etapa hasta 70°C. Si se requiere o desea, el solvente orgánico se puede ahora eliminar por evaporación, diálisis, ultrafiltración, diafiltración, o cromatografía de exclusión molecular mientras en la misma etapa el medio de dispersión se puede intercambiar a una composición de tampón final deseada tal como PBS. Opcionalmente, la composición se puede extruir a través de filtros de membrana de tamaño de poro deseado para esterilización y/o para obtener una formulación monodispersa.

Como una alternativa al procedimiento de mezclado descrito anteriormente, el ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, y el componente lipidoide se pueden mezclar con un dispositivo automatizado para micromezclado tal como se describe, por ejemplo, por Hirota y col. (Hirota et al. 1999, *Biotechniques*, 27, 286-290) o Kasper y col. (Kasper et al. 2011, *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185) o por enfoque microfluídico tal como se revisa por Xuan y col. (Xuan et al. 2010, *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 1-16).

Una alternativa para obtener composiciones que comprenden lipidoide según la presente invención es a través de liposomas o micelas como un intermedio. Los lipoplejos con frecuencia se preparan de reactivos de transfección comercialmente disponibles que son micelas o liposomas en suspensión acuosa. Los lipidoide de la presente divulgación se pueden usar para preparar micelas o liposomas. Muchas técnicas para preparar micelas y liposomas se conocen en la técnica, y cualquier método se puede usar con los lipidoide inventivos para hacer micelas o liposomas. Además, cualquier agente incluyendo ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, moléculas pequeñas, proteínas, péptidos, metales, compuestos organometálicos, etc., se pueden incluir en una micela o liposoma. En ciertas formas de realización, se forman liposomas (vesículas de lípidos o lipidoide) mediante ensamblaje espontáneo. En otras formas de realización, se forman liposomas cuando finas películas de lípidos o tortas de lípidos se hidratan y pilas de bicapas cristalinas lipídicas se vuelven fluidas y se hinchan. Las láminas de lípidos hidratadas se separan durante la agitación y se autocierran para formar grandes vesículas multilamelares (LMV). Esto previene la interacción de agua con el núcleo hidrocarbonado de las bicapas en los extremos. Una vez se han formado estos liposomas, reducir el tamaño de la partícula se puede modificar mediante aporte de energía sónica (sonicación) o energía mecánica (extrusión) (Szoka et al, 1980, *Ann Rev Biophys Bioeng*, 9, 467-508). La preparación de liposomas implica preparar los lipidoide para hidratación, hidratar los lipidoide con agitación, y dar tamaño a las vesículas para lograr una distribución homogénea de liposomas. Para este fin, los componentes lipídicos que se van a comprender en una composición de la presente invención se disuelven como soluciones madre en solvente orgánico tal como cloroformo. Los componentes se mezclan después en la proporción estequiométrica deseada y el solvente orgánico se elimina por evaporación giratoria en un recipiente adecuado tal como un matraz de fondo redondo, lo que produce una capa fina de lípido en la pared del recipiente. Preferiblemente, la película se seca a alto vacío. La hidratación de la película/torta de lipidoide se logra añadiendo un medio acuoso al envase de lipidoide seco y agitando la mezcla. La ruptura de las suspensiones de LMV usando energía sónica típicamente produce pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con diámetros en el intervalo de 15-50 nm. La extrusión de lípidos es una técnica en la que una suspensión de

lípidos se fuerza a través de un filtro de policarbonato con un tamaño de poro definido para dar partículas que tienen un diámetro cerca del tamaño de poro del filtro usado. La extrusión a través de filtros con poros de 100 nm típicamente da vesículas unilamelares grandes (LUV) con un diámetro medio de 120-140 nm. Ciertos lipídoides pueden autoensamblarse espontáneamente alrededor de ciertas moléculas, tal como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARNm), para formar liposomas. En algunas formas de realización, la aplicación es la administración de ARN, preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm. El uso de estos lipídoides permite el ensamblaje simple de liposomas sin la necesidad de etapas adicionales o dispositivos tal como un extrusor.

La composición de la presente invención que comprende un ARN monocatenario tal como ARNm, se puede después preparar por autoensamblaje tras mezclar las soluciones de los componentes. El autoensamblaje se puede lograr mezclando a mano usando pipeteo y agitación/vórtex o usando un dispositivo automatizado para micromezclado tal como se describe, por ejemplo, por Hirota y col. (Hirota et al. 1999, *Biotechniques*, 27, 286-290) o Kasper y col. (Kasper et al. 2011, *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185) o por enfoque microfluídico tal como se revisa por Xuan y col. (Xuan et al. 2010, *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 1-16). Si la composición de la presente invención comprende componentes adicionales además del ARN monocatenario tal como ARNm y el oligómero, polímero o lipidoide de la presente divulgación, se puede requerir el mezclado secuencial. En este caso, cualquier componente adicional se puede añadir después del autoensamblaje del oligómero, polímero o lipidoide y el ARN monocatenario tal como ARNm, o se puede añadir a cualquiera de estos antes de mezclar. La secuencia más adecuada de etapas de mezclado dependerá de la naturaleza química de los componentes adicionales. Por ejemplo, si el componente adicional está negativamente cargado, puede ser lo más adecuado añadirlo al componente de ARN preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, antes de mezclar con el oligómero, polímero o lipidoide o a un complejo preformado del oligómero, polímero o lipidoide y el ARN preferiblemente ARN monocatenario tal como ARNm, donde el oligómero, polímero o lipidoide está presente en exceso en términos de proporción de cargas positivas sobre la suma de las cargas negativas del ARN(m) y el componente adicional aniónico. Viceversa, si el componente adicional es catiónico, puede ser lo más adecuado añadirlo al oligómero, polímero o lipidoide antes de mezclarlo con el ARN(m). O se puede usar a una estequiometría para neutralizar parcialmente las cargas negativas del ARN(m) seguido por mezclar con la solución de oligómero, polímero o lipidoide de la presente divulgación.

En el caso de complejos que comprenden ARN(m) para magnetofección, se ha mostrado que la agregación de coloides inducida por sal es un medio adecuado para preparar composiciones que comprenden un ARN(m), un poliación o lípido catiónico y partículas magnéticas (documento EP1297169). En el caso especial de que el componente de ARN(m) sea un oligonucleótido catiónico, se puede usar un polianión para autoensamblar el oligómero, polímero o lipidoide de la presente divulgación con el ARN(m). En este caso, el oligómero, polímero o lipidoide de la presente divulgación se mezcla con el oligonucleótido catiónico seguido por mezclar con el polianión. El experto en la materia sabe bien que están disponibles numerosas opciones de formulación para obtener la composición de la presente invención. Las concentraciones de los componentes individuales se eligen según el uso pretendido de la composición de la presente invención. Los parámetros relevantes son la concentración final del componente ARN(m) y la proporción de componentes como se ha descrito anteriormente. Para la administración de ARN(m) en cultivo celular, concentraciones finales de ARN(m) entre 1 y 100 µg/ml en general son preferidas. Para aplicaciones in vivo, concentraciones de ARN(m) finales útiles puede ser hasta 5 mg/ml.

La composición de la presente invención se puede almacenar en suspensión acuosa o puede estar seca. Por tanto, en una forma de realización preferida, la composición de la presente invención se almacena en forma seca, opcionalmente en forma liofilizada. En una forma de realización más preferida, el complejo o composición seca o liofilizada también comprende un lioprotector. Los lioprotectores son moléculas que protegen material seco/liofilizado. Tales moléculas son típicamente compuestos polihidroxi tal como azúcares (mono-, di- y polisacáridos), polialcoholes y sus derivados. Se sabe que trehalosa y sacarosa son protectores naturales para procesos de secado. La trehalosa se produce por una variedad de plantas, hongos y animales invertebrados que permanecen en un estado de animación suspendida durante periodos de sequía (también conocido como anhidrobiosis). Los azúcares tal como trehalosa, lactosa, rafinosa, sacarosa, manosa, sorbitol, manitol, xilitol, polietilenglicol, dextrinas, urea, maltodextrinas, fructanos, maltooligosacáridos, manooligosacáridos, cicloinulohexaosa, hidroxietil almidón, dextranos, inulina, polivinilpirrolidona o aminoácidos tal como triptófano, glicina y fenilalanina son lioprotectores particularmente adecuados en el ámbito de la presente invención. Lo más preferiblemente, se usa trehalosa en este contexto.

#### Aspectos farmacéuticos

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de la composición de la presente invención para administrar un ARN monocatenario tal como ARNm a un tejido o dentro de una célula diana. El término "administrar un ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula" preferiblemente significa la transferencia del ARN, preferiblemente un ARN monocatenario tal como ARNm, dentro de la célula. Dicho uso puede ser in vivo o in vitro.

La presente invención también se refiere a un método para administrar un ARN monocatenario tal como ARNm, a una célula o tejido diana que comprende la etapa de poner en contacto una composición según la invención con la célula o tejido diana. Tal método se puede llevar a cabo in vitro o in vivo. El poner en contacto se puede lograr por medios y métodos que conoce el experto en la materia. Por ejemplo, si el método se lleva a cabo in vitro, el poner en contacto

se puede lograr cultivando las células en presencia de la composición en el medio de cultivo o añadiendo la composición a las células. Si el método se lleva a cabo in vivo, el poner en contacto con células o tejidos se puede lograr, por ejemplo, por la administración de la composición a un individuo por rutas de administración que conoce el experto en la materia, en particular por cualquier ruta de administración que habitualmente se emplea en el campo de la terapia génica. Las posibles maneras de formular la composición y de administrarla a un individuo también se describen más adelante.

El término "in vivo" se refiere a cualquier aplicación que se efectúa al cuerpo de un organismo vivo en donde dicho organismo es preferiblemente multicelular, más preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano. El término "in vitro" se refiere a cualquier aplicación que se efectúa a partes del cuerpo de un organismo vivo aisladas y fuera de dicho organismo, por ejemplo, células, tejidos y órganos, en donde dicho organismo es preferiblemente multicelular, más preferiblemente un mamífero y lo más preferiblemente un ser humano.

La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición de la invención y opcionalmente un soporte y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. El término "composición farmacéutica" se refiere a una forma farmacéuticamente aceptable de la composición de la presente invención que se puede administrar a un sujeto.

El término "forma farmacéuticamente aceptable" significa que la composición se formula como una composición farmacéutica, en donde dicha composición farmacéutica puede comprender además un soporte y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de soportes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones, tal como emulsiones de agua/aceite, varios tipos de agentes humectantes, soluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales soportes se pueden formular por métodos convencionales bien conocidos. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar al sujeto a una dosis adecuada. La pauta de dosis la determinará el médico y factores clínicos. Como se sabe bien en las artes médicas, las dosis para cualquier sujeto dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño del sujeto, el área de superficie corporal, edad, el compuesto particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administren al mismo tiempo. Una dosis típica de sustancias activas puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 ng a varios gramos. Aplicado a terapia de ARN(m), la dosis de un ARN(m) para expresión o para inhibición de la expresión debe corresponder a este intervalo; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de este intervalo ejemplar, especialmente considerando los factores anteriormente mencionados. En general, la pauta como una administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 0,1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal al día. Si la pauta es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 µg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal, respectivamente. Se puede seguir la evolución mediante evaluación periódica. Las dosis variarán, pero una dosis preferida para la administración intravenosa de los ARN(m) como constituyentes de la composición de la presente invención es desde aproximadamente  $10^6$  a  $10^{19}$  copias de la molécula de ARN(m).

El término "administrado" abarca cualquier método adecuado para introducir la composición en el cuerpo de un sujeto. La administración de las composiciones adecuadas se puede efectuar de diferentes maneras, por ejemplo, por administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, transdérmica, intratecal, intramuscular, tópica, intradérmica, intranasal, pulmonar por inhalación o intrabronquial u oral o rectal. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar, en particular, como una matriz activada por genes tal como se describe por Shea y col. (Shea et al. 1999, Nat Biotechnol, 17, 551-554) y en el documento EP1198489.

En principio las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden administrar local o sistémicamente. La administración será preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, aunque otros modos de administración están dentro del ámbito de la invención. La administración directamente al sitio diana, por ejemplo, por catéter a un sitio en un vaso sanguíneo, también es concebible. La administración también se puede producir, por ejemplo, por inyección directa al sitio diana tal como un tumor. También está dentro del ámbito de la invención la administración por aerosolización o nebulización o la administración oral. Las preparaciones para la administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de solventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, fluorocarbonos, aceites vegetales tal como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tal como oleato de etilo. Los soportes acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato, o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen regeneradores de fluido y nutrientes, regeneradores de electrolitos (tal como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tal como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica puede comprender agentes adicionales tal como interleuquinas o interferones dependiendo del uso pretendido de la composición farmacéutica.

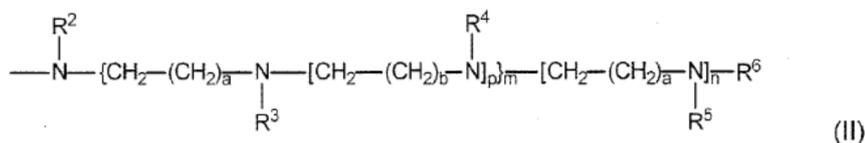
En otra forma de realización la presente invención se refiere a un método de tratamiento que comprende administrar la composición farmacéutica de la presente invención a un paciente con el fin de que el ARN monocatenario tal como ARNm contenido en dicha composición produzca un efecto preventivo o terapéutico. Notablemente, el término "paciente" abarca animales y seres humanos.

Al administrar la composición farmacéutica de la presente invención, se pueden tratar o prevenir enfermedades. El término "enfermedad" se refiere a cualquier afección patológica concebible que se puede tratar, prevenir o vacunar contra empleando una forma de realización de la presente invención. En una forma de realización preferida de dicho método, dichas enfermedades pueden ser heredadas, adquiridas, infecciosas o no infecciosas, relacionadas con la edad, cardiovasculares, metabólicas, intestinales, neoplásicas (en particular, cáncer) o genéticas. Una enfermedad se puede basar, por ejemplo, en irregularidades de procesos fisiológicos, procesos moleculares, reacciones bioquímicas en un organismo que a su vez se pueden basar, por ejemplo, en el equipamiento genético de un organismo, o factores conductuales, sociales o medioambientales tal como la exposición a sustancias químicas o radiación. En una forma de realización particularmente preferida, la composición farmacéutica de la presente invención se usa para tratamientos como se divulga en la solicitud de patente WO2010EP04681.

En línea con el método de tratamiento descrito anteriormente, la presente invención se refiere en otra forma de realización al uso de la composición de la presente invención para la preparación de una composición farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad que se puede tratar proporcionando dicho ARN monocatenario tal como ARNm, contenido en dicha composición a un tejido u órgano en el cuerpo de un paciente afectado por una enfermedad.

Para ilustración adicional, se resumen aspectos preferidos de la divulgación en los siguientes puntos.

1. Un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal:



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (II) en una pluralidad de tales grupos:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C=C; un grupo protector para un grupo amino; y una cadena de poli(etilenglicol);

R<sup>6</sup> se selecciona de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueno de C3-C18 que tiene un doble enlace C=C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor,

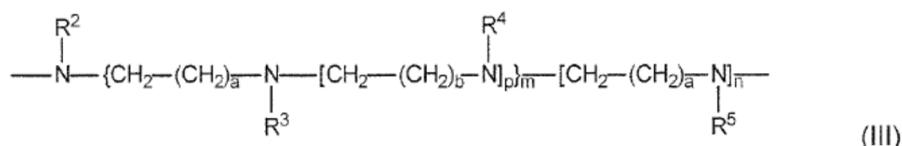
y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II).

2. El oligómero o polímero del punto 1, en donde, en la fórmula (II), p es 1.
3. El oligómero o polímero del punto 1 o 2, en donde, en la fórmula (II), n es 1.
4. El oligómero o polímero del punto 1 o 2, en donde, en la fórmula (II), m es 1 y n es 1.
5. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde, en la fórmula (II), a es 1 y b es 2 o a es 2 y b es 1.
6. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde, en la fórmula (II), R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> son hidrógeno.
7. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde, en la fórmula (II), R<sup>6</sup> es hidrógeno.
8. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 1 a 5, que es un polímero.
9. El polímero del punto 8, en donde el esqueleto de polímero que porta una pluralidad de grupos de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal se selecciona de un poli(aminoácido) que comprende una pluralidad de unidades de ácido glutámico o aspártico, tal como poli(ácido glutámico) y poli(ácido aspártico), una proteína, un polialquino, una poliamina, ácido poliacrílico, ácido polimetacrílico, ácido polimaleico, polisulfonato, sulfonato de poliestireno, polifosfato, polisulfato de pentosano, poli(ácido vilnilfosfórico), poli(butadieno-co-ácido maleico), poli(acrilato de etilo-co-ácido acrílico), poli(etileno-co-ácido acrílico), poli(etileno-co-anhidrido maleico),

poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico), poli(metacrilato de metilo-co-ácido metacrílico), poli(ácido estirenosulfónico-co-ácido maleico), poli(cloruro de vinilo-co-acetato de vinilo-co-ácido maleico), un hidrato de carbono tal como heparina, sulfato de heparán, poli(ácido glucurónico), poli(ácido galacturónico), ácido hialurónico, poli(ácidos urónicos) en general, o un dendrímero terminado en carboxi.

- 5
10. El polímero del punto 9, que se selecciona de un poli(aminoácido) que comprende una pluralidad de unidades de ácido glutámico o aspártico, ácido poliacrílico y ácido polimetacrílico.
11. Un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas:

10



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (III) en una pluralidad de tales grupos:

15

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1, p es 1 o 2, m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

20

R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, o -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; y una cadena de poli(etilenglicol); y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III).

25

12. El oligómero o polímero del punto 11, en donde, en la fórmula (III), p es 1.

13. El oligómero o polímero del punto 11 o 12, en donde, en la fórmula (III), n es 1.

30

14. El oligómero o polímero del punto 11 o 12, en donde, en la fórmula (III), m es 1 y n es 1.

15. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 11 a 14, en donde, en la fórmula (III), a es 1 y b es 2 o a es 2 y b es 1.

35

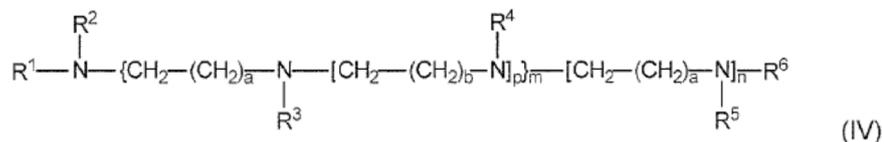
16. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 11 a 15, en donde, en la fórmula (III), R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> son hidrógeno.

17. El oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 11 a 16, que es un polímero.

18. El polímero del punto 17, que es un dendrímero.

40

19. Un lipidoide que tiene la estructura de fórmula (IV):



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue:

45

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1, p es 1 o 2, m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

50

R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor; siempre que al menos dos residuos entre R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> sean un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C;

55

y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IV) pueden estar protonados para proporcionar un lipidoide catiónico de fórmula (IV).

20. El lipidoide del punto 19, en donde, en la fórmula (IV), p es 1.
21. El lipidoide del punto 19 o 20, en donde, en la fórmula (IV), n es 1.
- 5 22. El lipidoide del punto 19 o 20, en donde, en la fórmula (IV), m es 1 y n es 1.
23. El lipidoide de cualquiera de los puntos 19 a 22, en donde, en la fórmula (IV), a es 1 y b es 2 o a es 2 y b es 1.
- 10 24. El lipidoide de cualquiera de los puntos 19 a 22, en donde, en la fórmula (IV), R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno y un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C8-C16 o alquenoilo de C8-C16 que tiene un doble enlace C-C; siempre que al menos dos residuos entre R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> sean un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup> o -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C8-C16 o alquenoilo de C8-C16 que tiene un doble enlace C-C.
- 15 25. Una composición que comprende un ARNm y un oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 1 a 18.
26. La composición del punto 25, en donde el oligómero o polímero es un oligómero o polímero catiónico.
27. La composición del punto 25, que comprende un complejo del ARNm y el oligómero o polímero catiónico.
- 20 28. Una composición que comprende un ARNm y un lipidoide de cualquiera de los puntos 19 a 24.
29. La composición del punto 28, en donde el lipidoide es un lipidoide catiónico.
- 25 30. La composición del punto 29, que comprende un complejo del ARNm y el lipidoide catiónico.
31. La composición de cualquiera de los puntos 25 a 30, que está forma liofilizada.
32. La composición del punto 31, que además comprende un lioprotector.
- 30 33. La composición del punto 32, en donde el lioprotector es trehalosa.
34. Una composición farmacéutica que comprende una composición de cualquiera de los puntos 25 a 33.
- 35 35. Uso de una composición de cualquiera de los puntos 25 a 33 para administrar un ARNm en una célula.
36. Uso de un oligómero o polímero de cualquiera de los puntos 1 a 18 o un lipidoide de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 24 para administrar un ARNm en una célula.
- 40 37. Un método para administrar un ARNm a una célula o tejido diana que comprende la etapa de poner en contacto una composición de cualquiera de los puntos 25 a 33 con la célula o tejido diana.

#### Descripción de las figuras

45 **Figura 1: Efecto del tipo de modificación de la cadena lateral de oligo(alquilenamina) de poli(ácido acrílico) sobre la eficacia de transfección de diferentes tipos celulares con ARNm.** Se formaron poliplejos usando poli(ácido acrílico) (MW: 8.000 Da) con modificaciones de cadena lateral (2-3-2) y (3-2-3) o los grupos control (3-3-3), (2-2-2), (2-2) o (3-4-3) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga en proporciones N/P entre 4 y 44 en los tipos celulares indicados. Después de 24 h las células transfectadas con diferentes cantidades de ARNm (500, 250, 125 o 50 62,5 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa.

**Figura 2: Ensayo de migración en gel para la determinación de la capacidad de formación de complejos de PAA8k modificado con (2-3-2) o (3-2-3).** Se formaron los poliplejos como se ha descrito en las proporciones N/P indicadas. La interacción de polímero y ARNm se analizó a través de migración en un gel de agarosa. Cuanto mejor es la interacción menor es la cantidad necesaria de polímero para una migración de ARNm completamente 55 obstaculizada.

**Figura 3: Ensayo RiboGreen para la determinación de la capacidad de formación de complejos de PAA8k modificado con (2-3-2) o (3-2-3).** Se formaron los poliplejos como se ha descrito en las proporciones N/P indicadas. La interacción de polímero y ARNm se analizó mediante la adición de RiboGreen. Esta molécula interacciona con 60 ácidos nucleicos, produciendo una señal de fluorescencia aumentada a altas cantidades de ARNm. Cuanto mejor es la interacción del ácido nucleico con el polímero, menor es la señal de fluorescencia detectada. Las señales se presentan como fluorescencia relativa comparada con un control que contiene la misma cantidad de ARNm libre.

65 **Figura 4: Eficacia de transfección de diferentes polímeros modificados con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2).** Los poliplejos se formaron usando los polímeros modificados con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-

propanodiamina indicados (PAA8k: poli(ácido acrílico), MW: 8.000 Da; Glu9.8K: poli(ácido glutámico), MW: 9.800 Da; PMA9.5k: poli(metacrilato), MW: 9.500 Da; Glu64k: poli(ácido glutámico), MW: 64.000 Da; GluLys: copolímero poli(ácido glutámico)-poli(lisina) (20.000-50.000 Da) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga en proporciones N/P entre 4 y 20. Después de 24 h las células transfectadas con diferentes cantidades de ARNm (500, 250, 125 o 62,5 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa.

**Figura 5: Eficacia de transfección de diferentes pesos moleculares de poli(ácido acrílico) modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2).** Los poliplejos se formaron usando los pesos moleculares indicados de poli(ácido acrílico) modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga en proporciones N/P entre 4 y 20. Después de 24 h las células transfectadas con diferentes cantidades de ARNm (500, 250, 125 o 62,5 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa.

**Figura 6: Citotoxicidad de formulaciones de ARNm polímero.** Se usaron complejos que comprenden poli(ácido acrílico) (MW: 8.000 Da, 20.000 Da y 70.000 Da) modificados con las oligo(alquilenamina)s indicadas y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga en proporciones N/P entre 4 y 44 y diferentes cantidades de ARNm. Después de 24 h se determinó la viabilidad celular como se describe. Los datos se muestran como el % de supervivencia comparado con células sin transfectar.

**Figura 7: Niveles de expresión de proteína indicadora de pulmones de ratón.** Se mezclaron poliplejos de PAA20k-(2-3-2) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a las proporciones N/P indicadas y se aplicó a los ratones a través de aerosol.

**Figura 8: Propiedades fisicoquímicas de poli(ácido acrílico) modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2).** Los poliplejos se formaron en condiciones in vivo a N/P 10. Polímero usado: poli(ácido acrílico), MW 20.000 Da.

**Figura 9: Imagen de microscopía electrónica de transmisión de PAA20k-(2-3-2) y ARNm.** Los poliplejos se mezclaron a N/P 10 y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Barra de escala: 100 nm. Polímero usado: poli(ácido acrílico), MW 20.000 Da.

**Figura 10: Expresión de luciferasa de luciérnaga en tejido de pulmón porcino después de la aplicación con aerosol de formulaciones de poliplejos.** Imágenes izquierdas brPEI N/P 10. Imágenes derechas PAA20k-(2-3-2) N/P 10. Polímero usado: poli(ácido acrílico), MW 20.000 Da.

**Figura 11. Efecto de trehalosa sobre la capacidad para liofilizar complejos de PAA20k-(2-3-2).** Los complejos se formaron como se ha descrito y se liofilizaron en presencia o ausencia de trehalosa al 1%. Como se demuestra, la trehalosa es capaz de conservar la eficacia de transfección del ARNm de estos complejos después de liofilización y rehidratación.

**Figura 12: Efecto de polímeros modificados con (2-3-2) y (3-2-3) sobre la eficacia de transfección de ADN.** Los poliplejos se formaron usando poli(ácido acrílico) (MW: 8.000 Da) con modificaciones de las cadenas laterales indicadas y ADNp que codifica para luciferasa de luciérnaga (pCMVLuc) a proporciones N/P entre 4 y 20. Después de 24 h las células transfectadas con diferentes cantidades de ADN (500, 250, 125 o 62,5 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa. Como control se usó PEI ramificado (brPEI) 25 kDa como reactivo de transfección.

**Figura 13: Silenciamiento génico inducido por ARNi usando complejos de GL3Luc-ARNip y poli(ácido acrílico) modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2).** Células HeLa que expresan de forma estable luciferasa de luciérnaga se transfectaron usando complejos de ARNip contra luciferasa de luciérnaga (Lucip) o ARNip control (GFPip) y PAA20k-(2-3-2) a las proporciones N/P indicadas y diferentes cantidades de ARNip. La expresión de luciferasa se analizó después de 24 h y se muestra como expresión relativa comparada con células sin tratar.

**Figura 14: Actividad de luciferasa de luciérnaga después de transfección de células NIH3T3 con diferentes complejos lipidoide/ARNm.** Se formaron complejos entre ARNm y lipidoide basados en (2-3-2) o las oligo(alquilenamina)s control (2-2-2) y (3-3-3) a proporciones p/p (peso de lipidoide/peso de ARNm) de 16.

**Figura 15: Efecto de la modificación de las cadenas laterales de oligo(alquilenamina) de poli(ácido acrílico) sobre la eficacia de transfección de ADN.** Los poliplejos se formaron usando poli(ácido acrílico) (MW: 8.000 Da) con modificaciones de las cadenas laterales indicadas y ADNp que codifica luciferasa de luciérnaga (pCMVLuc) a proporciones N/P indicadas. Después de 24 h las células transfectadas con diferentes cantidades de ADN (500, 250, 125 o 62,5 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa. En contraste a la transfección de ARNm (véase la figura 1) la modificación de la cadena lateral de oligo(alquilenamina) no afecta marcadamente a la eficacia de transfección.

**Figura 16: Expresión de luciferasa de luciérnaga en hígado y bazo murino después de inyección intravenosa de formulaciones de lipidoide.** Izquierda: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; proporción en peso 3,6:0,18:0,76:1) en PBS para inyección. Derecha: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2):

DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; proporción en peso 3,6:0,18:0,76:1) en agua para inyección. Solo las formulaciones en PBS produjeron expresión en hígado y bazo (PBS:  $1,6404 \times 10^5$  fotones/s; agua: no detectable).

**Figura 17: Expresión de luciferasa de luciérnaga en hígado y bazo murino después de inyección intravenosa de formulaciones de lipidoideas.** A: imagen de bioluminiscencia in vivo: Izquierda: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C14-(2-3-2) (C14-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; 8:6:5:1) en PBS para inyección; Medio: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C16-(2-3-2) (C16-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; 8:6:5:1) en PBS para inyección; Derecha: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; 8:6:5:1) en PBS para inyección. B. Cuantificación de la señal de bioluminiscencia in vivo. Los niveles de expresión disminuyen al aumentar la longitud de la cadena alquilo de C12-C16.

**Figura 18: Expresión de luciferasa de luciérnaga en hígado y bazo murino después de inyección intravenosa de formulaciones de lipidoideas.** Se extirparon hígado, bazo, riñón, estómago, corazón, pulmones y cerebro de los ratones tratados mostrados en la figura 17 y se hicieron imágenes para expresión de luciferasa. A. Imagen de bioluminiscencia: Izquierda: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C12-(2-3-2) (C12-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; 8:6:5:1) en PBS para inyección; Medio: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C14-(2-3-2) (C14-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; 8:6:5:1) en PBS para inyección; Derecha: ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga formulado con lipidoide C16-(2-3-2) (C16-(2-3-2): DOPE:Coolesterol:DSPE:PEG2k; 8:6:5:1) en PBS para inyección. La expresión de luciferasa en hígado disminuyó al aumentar la longitud de la cadena de alcano de los lipidoideas (C16<C14<C12) y era apenas detectable para C16. La expresión de luciferasa en bazo era más alta para C14. Se observó alguna expresión de luciferasa en pulmones, pero no se observó ninguna en corazón, riñón, estómago o cerebro. B. Cuantificación de la señal de bioluminiscencia de A.

**Figura 19: Comparación de la eficacia de diferentes reactivos de transfección sobre su capacidad para administrar ADNp y ARNm.** Los poliplexos se formaron usando los reactivos de transfección indicados (estructuras según la nomenclatura de la patente correspondiente WO 2011/154331: #46 C-Stp3-C-K-OleA2; #454: C-Y3-Stp2-K(K-OleA2)-Stp2-Y3-C; #512: C-Sph3-K(Sph3-C)2). Como carga útil de ácido nucleico se usó ARNm o ADNp (pCMVLuc) que codifica luciferasa de luciérnaga a las proporciones N/P indicadas. Después de 24 h las células NIH3T3 transfectadas con diferentes cantidades de ARNm (500, 250, 125 o 63 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa.

**Figura 20: Comparación de la eficacia de transfección de PAA8k, modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2) o N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-butanodiamina (2-4-2).** Los poliplexos se formaron usando PAA8k modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2) o N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-butanodiamina (2-4-2) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a las proporciones N/P indicadas. Después de 24 h las células NIH3T3 transfectadas con diferentes cantidades de ARNm (500, 250, 125 o 63 ng) se lisaron y se analizó la actividad luciferasa.

**Figura 21. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de lipoplejos.** Se formaron complejos lipidoide/ARNm como se ha descrito y se analizaron mediante microscopía electrónica de transmisión. Carril superior: C10-(2-3-2)/DOPE/Col/DPG-PEG, carril inferior: C10-(2-3-2)/DPPC/Col/DPG-PEG; imágenes izquierdas vista general escala: 100 nm; imágenes derechas: zoom detallado escala 20 nm.

**Figura 22: Eficacia de transfección de C10-(2-3-2) sintetizado a partir de 1-bromodecano.** C10-(2-3-2) se sintetizó como se describe en el ejemplo de producción VII usando 1-bromodecano. La eficacia de transfección se probó en células NIH3T3 usando dosis de 500 ng, 250 ng y 125 ng por pocillo.

**Figura 23: Eficacia de transfección de C12-(2-3-2) sintetizado a partir de N-dodecilacrilamida.** C12-(2-3-2) se sintetizó como se describe en el ejemplo de producción VIII usando N-dodecilacrilamida. La eficacia de transfección se probó en células NIH3T3 usando dosis de 500 ng, 250 ng y 125 ng por pocillo.

**Figura 24: Eficacia de transfección de C12-(2-3-2) sintetizado a partir de acrilato de dodecilo.** C12-(2-3-2) se sintetizó como se describe en el ejemplo de producción IX usando acrilato de dodecilo. La eficacia de transfección se probó en células NIH3T3 usando dosis de 500 ng, 250 ng y 125 ng por pocillo.

**Figura 25: Eficacia de transfección de formulación de lipidoide basado C12-(2-3-2).** Se generaron formulaciones de lipidoideas usando C12-(2-3-2) y DMG-PEG2k en combinación con DOPE o DSPC con ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a N/P 17 o 8.

**Figura 26: Comparación de oligo(alquilenamina)s (2-3-2), (3-3-3) y (2-2-2) modificadas en C12 sobre la eficacia de transfección in vivo.**

**Figura 27: Comparación de la eficacia de la versión de C12-(2-3-2) con C12-cadena de alquilo de saturación y posicionamiento alterados.** A: estructura química de diferentes versiones de C12-(2-3-2); B: Nivel de expresión de

la proteína indicadora (luciferasa de luciérnaga) después de transfección de células NIH3T3 con las formulaciones que comprenden los diferentes lípidos.

5 **Figura 28: Estabilidad de liofilización de lipoplejos.** Se formaron formulaciones de lipoides como se ha descrito, se liofilizaron frente a agua y se mezclaron con diferentes concentraciones de lioprotectores (trehalosa (A, D), sacarosa (B, E) y lactosa (C, F)). Después de congelación, liofilización y resuspensión, se midió la eficacia de transfección en células NIH3T3 (A-C) y el diámetro hemodinámico (D-F) y se compararon con lipoplejos recién preparados en las mismas condiciones.

10 **Figura 29: Expresión de ARNm en muestras ex vivo después de transfección con formulaciones lipoides que contienen C12-(2-3-2).** A: músculo de cerdo, todas las muestras tratadas; B: tejido graso de cerdo, todas las muestras tratadas; C: arteria de oveja; D: músculo de oveja, muestra superior: tratada, muestra inferior: no tratada; E: pulmón de oveja, muestra superior: tratada, muestra inferior: no tratada.

15 **Figura 30. Análisis de inmunotransferencia de lisados celulares en proteína ACE-2.** Carriles izquierdos: lisado de células tratadas con ARNm de ACE-2; carriles derechos: lisado de células tratadas con formulaciones de lipoides sin ARNm (vacío). Fila superior: tinción de ACE-2; Fila inferior: GAPDH, control de carga.

20 **Figura 31. Expresión de eritropoyetina murina en ratones.** Se analizaron muestras de sangre para mEPO 6 h después de la administración intravenosa de una formulación C12-(2-3-2) que contenía ARN de mEPO. Se analizaron tres dosis diferentes de ARN (20 µg, 10 µg o 5 µg) y un grupo control (PBS).

25 **Figura 32: Comparación de la eficacia de transfección de poli(alilamina) (PALAM) diferentemente modificada.** Se transfectaron células NIH3T3 usando poliplejos compuestos de ARNm que codifica luciferasa en complejo con PALAM-(2-3-2), PALAM-(2-2-2) o PALAM-(3-3-3).

30 **Figura 33: Comparación de la eficacia de transfección de polipropilemimina (PPI) diferentemente modificada.** Se transfectaron células NIH3T3 usando poliplejos compuestos de ARNm que codifica luciferasa en complejo con PPI-(2-3-2), PPI-(2-2-2) o PPI-(3-3-3).

35 **Figura 34: Expresión de luciferasa después de inyección subcutánea de una formulación de C12-(2-3-2).** C12-(2-3-2)/DOPE/colesterol/DMG-PEG2k que contiene ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención.

#### Ejemplo de producción I:

*Síntesis de poli(ácido acrílico), MW 8.000 Da, modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina, PAA8k-(2-3-2):*

40 Se diluyeron 10 mg de la sal sódica de poli(ácido acrílico) (MW: 8.000 Da, Sigma Aldrich) en 2 ml de tampón de reacción que contenía MES 50 mM, pH 6,0. Se diluyeron 1,69 g de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (100 eq./grupo carboxi, Sigma Aldrich) en 2 ml de mismo tampón. Como la oligo(alquilenamina) se compró como la base libre, el pH se reajustó a pH 6,0 por adición gota a gota de HCl al 32%. El poli(ácido acrílico) y la solución de oligo(alquilenamina) se mezclaron. Para empezar la reacción se añadió un exceso molar de 10 veces de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Sigma Aldrich, diluido en 2 ml de tampón de reacción) por grupo carboxilo. El volumen final se ajustó a 10 ml. La mezcla se incubó durante 3 h a temperatura ambiente en un agitador suspendido. El producto se purificó por diálisis. Para este fin, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis slide-a-lyzer (3-12 ml, MWCO: 3.500 Da, Thermo Fisher) y se dializó frente a agua durante 72 horas. El agua se intercambió dos veces al día. Después de la diálisis el polímero purificado se liofilizó. En las mismas condiciones los polímeros enumerados en la siguiente tabla 1 se sintetizaron y ensayaron:

Tabla 1: Lista de polímeros modificados con oligo(alquilenamina) sintetizados.

Esqueleto polimérico		Oligo(alquilenamina)			Polímero resultante	Ejemplo
Nombre	Fabricante/Nr. de producto	Nombre	Fabricante/Nr. de producto			
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416029	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333131	PAA8k-(2-3-2)	1, 2, 3, 4, 8, 9	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416030	1,2-bis(3-aminopropilamino)etano	Sigma aldrich, 23939-9	PAA8k-(3-2-3)	1, 2, 4, 8	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416031	N,N'-bis(2-aminopropil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 40810	PAA8k-(3-3-3)	1, 4	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416032	Trietilentetramina	Sigma aldrich, 132098	PAA8k-(2-2-2)	1, 4	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416034	Dietilentriammina	Sigma aldrich, D95855	PAA8k-(2-2)	1	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416035	Espermina	Sigma aldrich, 85590	PAA8k-(3-4-3)	1, 4	
poli(ácido glutámico) sal sódica, 3.000-12.000 Da	Sigma aldrich, P4636	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333131	GlU9,8k-(2-3-2)	3	
poli(ácido metacrílico) sal sódica, 9.500 Da	Sigma aldrich, 434507	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333131	PMA9,5k-(2-3-2)	3	
poli(ácido glutámico) sal sódica, 50.000-100.000 Da	Sigma aldrich, P4886	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333132	GlU64k-(2-3-2)	3	
poli(D-Glu, D-Lys) 20.000-50.000 Da	Sigma aldrich, P7658	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333133	GlUly3-(2-3-2)	3	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 1.200 Da	Sigma aldrich, 416010	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333134	PAA1,2k-(2-3-2)	3	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 20.000 Da	Polysciences Inc, 18747	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333135	PAA20k-(2-3-2)	3, 4, 5, 6, 7	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 35.000 Da	Polysciences Inc, 18748	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333136	PAA35k-(2-3-2)	3	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 70.000 Da	Polysciences Inc, 18749	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333137	PAA70k-(2-3-2)	3, 4	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 240.000 Da	Sigma aldrich, 192058	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333138	PAA240k-(2-3-2)	3	
poli(ácido acrílico) sal sódica, 8.000 Da	Sigma aldrich, 416031	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-butanodiamina	Santai Labs, ADH 2970	PAA8k-(2-4-2)	14	

**Ejemplo de producción II:**

*Síntesis de un elemento básico de oligo(alquilenamina) para la generación de polímero de tipo cepillo por síntesis de péptidos soportada en fase sólida*

5 I. Síntesis de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina protegida con tri(Boc) (EPE(Boc)<sub>3</sub>).

Se solubilizan 5 g de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (31,2 mmol) en 100 ml de diclorometano (DCM) y se enfría a 0°C. Se diluyen 4,43 g de trifluoroacetato de etilo (31,2 mmol, 1 eq/molécula) en 100 de DCM y se añaden gota a gota a la solución agitada durante un periodo de 4 h. Después de la adición, la solución se agita a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añaden 19,46 ml de trietilamina (14,2 g, 0,1404 mol, 1,5 eq/amina libre) a la mezcla de reacción. Se solubilizan 30,64 g de dicarbonato de di-tert-butilo (0,1404 mol, 1,5 eq/amina) en 100 ml de DCM, se añade gota a gota a la solución agitada y se incuba a temperatura ambiente durante 24 h con agitación constante. Después de la reacción, la fase orgánica se concentra a aproximadamente 100 ml y se lava 3 veces con NaHCO<sub>3</sub> al 5% y 3 veces con agua. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y el solvente se evapora. El producto se diluye en 100 ml de metanol y 200 ml de NaOH 3 M (20 eq/molécula) y se agita durante la noche a temperatura ambiente. El metanol se evapora y la solución acuosa se lava 3 veces con DCM. La fase orgánica se recoge, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y evapora. La molécula resultante (EPE(Boc)<sub>3</sub>) se analiza por <sup>1</sup>H-RMN.

20 II. Síntesis de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina bocilada modificada con Fmoc-ácido glutámico (Fmoc-Glu(EPE(Boc)<sub>3</sub>-OH).

Se mezclan 3,5 g de N-(9-fluorenilmetoxicarbonil)-ácido-L-glutámico (Fmoc-Glu-OH, 9,47 mmol) con 100 ml de anhídrido acético, se calienta a 100°C en un baño de aceite a reflujo y agitación constante hasta que la solución de vuelve transparente. La solución se enfría en hielo y los solventes se eliminan por evaporación al vacío a 60°C. El producto se solubiliza en 100 ml de tetrahidrofurano. Se diluyen 5,24 g de EPE(Boc)<sub>3</sub> (11,37 mmol, 1,2 eq/molécula) en 100 ml de tetrahidrofurano, se mezcla con 3,3 ml de N,N-diisopropiletilamina (18,94 mmol, 2 eq/molécula) y se añade a la solución que contiene ácido glutámico. La mezcla de reacción se agita durante 2 h a temperatura ambiente. Después de la concentración de la solución por evaporación, se diluye en DCM y se lava 3 veces con tampón citrato trisódico (0,1 M, pH 5,5). Después de secar la fase orgánica sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro la muestra se purifica por cromatografía rápida en columna seca en una columna de gel de sílice usando un gradiente por etapas de heptano/acetato de etilo (de 50/50 a 0/100) y acetato de etilo/metanol (de 100/0 a 80/20). Las fracciones que contienen una señal de UV en TLC de sílice se juntan, el solvente se evapora y el producto se analiza por <sup>1</sup>H-RMN.

**Ejemplo de producción III:**

*Síntesis de un elemento básico de oligo(alquilenamina) para la generación de polímeros lineales y ramificados por síntesis de péptidos soportada en fase sólida*

40 I. Síntesis de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina protegida con di(Boc) (EPE(Boc)<sub>2</sub>).

Se solubilizan 5 g de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (31,2 mmol) en 100 ml de diclorometano (DCM) y se enfría a 0°C. Se diluyen 8,86 g de trifluoroacetato de etilo (62,4 mmol, 2 eq/molécula) en 100 de DCM y se añaden gota a gota a la solución agitada durante un periodo de 4 h. Después de la adición, la solución se agita a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, se añaden 13 ml de trietilamina (9,47 g, 0,0936 mol, 1,5 eq/amina libre) a la mezcla de reacción. Se solubilizan 20,43 g de dicarbonato de di-tert-butilo (0,0936 mol, 1,5 eq/amina) en 100 ml de DCM, se añade gota a gota a la solución agitada y se incuba a temperatura ambiente durante 24 h con agitación constante. Después de la reacción, la fase orgánica se concentra a aproximadamente 100 ml y se lava 3 veces con NaHCO<sub>3</sub> al 5% y 3 veces con agua. La fase orgánica se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y el solvente se evapora. El producto se diluye en 100 ml de metanol y 200 ml de NaOH 3 M (20 eq/molécula) y se agita durante la noche a temperatura ambiente. El metanol se evapora y la solución acuosa se lava 3 veces con DCM. La fase orgánica se recoge, se seca sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra y evapora. La molécula resultante (EPE(Boc)<sub>2</sub>) se analiza por <sup>1</sup>H-RMN.

55 II. Síntesis de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina bocilada, protegida con Fmoc, succinilada (Fmoc-(EPE(Boc)<sub>2</sub>-OH).

Se resuelven 3,0 g de (EPE(Boc)<sub>2</sub>) en 50 ml de tetrahidrofurano y se enfría a 0°C. Se disuelven 0,996 g de anhídrido succínico (10 mmol, 1,2 eq/molécula) en 200 ml de tetrahidrofurano y se añade gota a gota a la solución agitada. Después de la adición la reacción se agita durante una hora adicional de temperatura ambiente. Se añaden 4,34 ml de N,N-diisopropiletilamina (33,2 mmol, 4 eq/molécula). Después 4,2 g de Fmoc éster de N-hidroxisuccinimida (12,45 mmol, 1,5 eq/molécula) disuelto en acetonitrilo/tetrahidrofurano se añaden gota a gota a la mezcla de reacción. La solución se agita durante la noche. La mezcla de reacción se concentra a aproximadamente 100 ml, se mezcla con 100 ml de diclorometano y se lava 5 veces con tampón citrato de sodio 0,1 M (pH 5,2). la fase orgánica se seca, concentra y el producto resultante se purifica por cromatografía rápida en columna seca en una columna de sílice usando un gradiente por etapas de n-heptano a acetato de etilo (100/0-0/100) y además a acetato de etilo en metanol

(100/0-80/20). Las fracciones que contienen una señal de UV en TLC de sílice se juntan, el solvente se evapora y el producto se analiza por <sup>1</sup>H-RMN.

**Ejemplo de producción IV:**

5

*Síntesis de lípidos basados en N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina*

10

Se mezclaron 100 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (0,623 mmol) con 575,07 mg de 1,2-epoxidodecano (3,12 mmol, (N-1) eq donde N es una cantidad 2x de amina primaria más una cantidad 1x de amina secundaria por oligo(alquilenamina)) y se mezcla durante 96 horas a 80°C con agitación constante. Después de la reacción el lípido se diluyó en tampón acetato de sodio 25 mM (pH 5) a una concentración de 100 µg/ml y se usó para transfección.

15

En las mismas condiciones se sintetizaron los lípidos enumerados en la tabla 2:

Tabla 2: Lista de lipidoideos sintetizados

Oligo(alquilamina)	Fabricante/Nr. de producto	Lípido	Fabricante/Nr. de producto	Lipidoide resultante	Ejemplo
N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333131	1,2-Epoxidodecano	Sigma aldrich, 260207	C12-(2-3-2)	10, 12
N,N'-bis(2-aminopropil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 404810	1,2-Epoxidodecano	Sigma aldrich, 260207	C12-(3-3-3)	10
Trietilentetramina	Sigma aldrich, 132098	1,2-Epoxidodecano	Sigma aldrich, 260207	C12-(2-2-2)	10
N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333131	1,2-Epoxitetradecano	Sigma aldrich, 260266	C14-(2-3-2)	10, 12
N,N'-bis(2-aminopropil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 404810	1,2-Epoxitetradecano	Sigma aldrich, 260268	C14-(3-3-3)	10
Trietilentetramina	Sigma aldrich, 132098	1,2-Epoxitetradecano	Sigma aldrich, 260269	C14-(2-2-2)	10
N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 333131	1,2-Epoxihexadecano	Sigma Aldrich, 260215	C16-(2-3-2)	12

**Ejemplo de producción V:**

*Síntesis de poli(alilamina) modificada con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina, (PALAM-(2-3-2))*

- 5 Se diluyeron 500 mg de solución de poli(alilamina) (Sigma-Aldrich, 20% p/p, peso molecular: 17.000 Da) en 2 ml de tampón de reacción que contenía MES 50 mM, pH 6,0. Se diluyeron 10,33 g de ácido succínico (50 eq por amina, Sigma-Aldrich) en 5 ml de mismo tampón. Las soluciones se juntaron y el pH se reajustó a pH 6,0. Para empezar la reacción se añadieron 3,36 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 10 eq. por amina, Sigma-Aldrich), diluido en 5 ml de tampón de reacción. La mezcla se incubó durante 3 h a temperatura ambiente en un agitador suspendido. El producto se purificó por diálisis. Para este fin, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis slide-a-lyzer (3-12 ml, MWCO: 10.000 Da, Thermo Fisher) y se dializó frente a agua durante 72 horas. El agua se intercambiaba dos veces al día. Después de la diálisis el polímero purificado se liofilizó.
- 10
- 15 Se diluyeron 5 mg de la poli(alilamina) modificada con ácido succínico, liofilizada en 2 ml de tampón de reacción que contenía MES 50 mM, pH 6,0. Se diluyeron 510,38 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (100 eq./grupo carboxi, Sigma Aldrich) en 2 ml de mismo tampón. Como la oligo(alquilenamina) se compró como la base libre, el pH se reajustó a pH 6,0 por adición gota a gota de HCl al 32%. La poli(alilamina) y la solución de oligo(alquilenamina) se mezclaron. Para empezar la reacción se añadió un exceso molar de 10 veces de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Sigma Aldrich, diluido en 4 ml de tampón de reacción) por grupo carboxilo. El volumen final se ajustó a 10 ml. La mezcla se incubó durante 3 h a temperatura ambiente en un agitador suspendido. El producto se purificó por diálisis. Para este fin, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis slide-a-lyzer (3-12 ml, MWCO: 3.500 Da, Thermo Fisher) y se dializó frente a agua durante 72 horas. El agua se intercambiaba dos veces al día. Después de la diálisis el polímero purificado se liofilizó.
- 20
- 25 En las mismas condiciones los polímeros enumerados en la siguiente tabla 3 se sintetizaron y ensayaron:

**Tabla 3: Lista de polímeros basados en poli(alilamina) modificados con oligo(alquilenamina) sintetizados**

Esqueleto polimérico		Oligo(alquilenamina)			Polímero resultante	Ejemplo
Nombre	Fabricante/Nr. de producto	Nombre	Fabricante/Nr. de producto			
poli(alilamina) 17.000 Da	Sigma aldrich, 479136	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	EvoBlock, KEMAM-003	PALAM-(2-3-2)	26	
poli(alilamina) 17.000 Da	Sigma aldrich, 479136	Trietilentetramina	Sigma aldrich, 132098	PALAM-(2-2-2)	26	
poli(alilamina) 17.000 Da	Sigma aldrich, 479136	N,N'-bis(2-aminopropil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 404810	PALAM-(3-3-3)	26	

**Ejemplo de producción VI:***Síntesis de polipropilenimina modificada con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina, (PPI-(2-3-2))*

- 5 Se disolvieron 100 mg de dendrímero de polipropilenimina hexadecaamina (PPI, generación 3.0, Sigma Aldrich) en 1,5 ml de tampón de reacción que contenía MES 50 mM, pH 6,0. Se disolvieron 11,2 g de ácido succínico (100 eq por amina primaria, Sigma-Aldrich) en 30 ml de mismo tampón. Las soluciones se juntaron y el pH se reajustó a pH 6,0. Para empezar la reacción se añadieron 1,81 g de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, 10 eq por amina primaria, Sigma Aldrich), diluido en 2 ml de tampón de reacción. La mezcla se incubó durante la noche a temperatura ambiente en un agitador suspendido. El producto se purificó por diálisis. Para este fin, la mezcla de reacción se cargó en casetes de diálisis slide-a-lyzer (3-12 ml, MWCO: 2.000 Da, Thermo Fisher) y se dializó frente a agua durante 72 horas. El agua se intercambió dos veces al día. Después de la diálisis el polímero purificado se liofilizó.
- 10
- 15 Se diluyeron 10 mg de PPI modificada con ácido succínico, liofilizada en 2 ml de tampón de reacción que contenía MES 50 mM, pH 6,0. Se diluyeron 0,776 g de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (100 eq./grupo carboxi, Sigma Aldrich) en 2 ml de mismo tampón. Como la oligo(alquilenamina) se compró como la base libre, el pH se reajustó a pH 6,0 por adición gota a gota de HCl al 32%. La polipropilenimina y la solución de oligo(alquilenamina) se mezclaron. Para empezar la reacción se añadió un exceso molar de 10 veces de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC, Sigma Aldrich, diluido en 4 ml de tampón de reacción) por grupo carboxilo. El volumen final se ajustó a 10 ml. La mezcla se incubó durante 5 h a temperatura ambiente en un agitador suspendido. El producto se purificó por diálisis. Para este fin, la mezcla de reacción se cargó en un casete de diálisis slide-a-lyzer (3-12 ml, MWCO: 3.500 Da, Thermo Fisher) y se dializó frente a agua durante 72 horas. El agua se intercambió dos veces al día. Después de la diálisis el polímero purificado se liofilizó.
- 20
- 25 En las mismas condiciones los polímeros enumerados en la siguiente tabla 4 se sintetizaron y ensayaron:

**Tabla 4: Lista de polímeros basados en poli(alilamina) modificados con oligo(alquilenamina) sintetizados**

Esqueleto polimérico		Oligo(alquilenamina)			Polímero resultante	Ejemplo
Nombre	Fabricante/Nr. de producto	Nombre	Fabricante/Nr. de producto			
Dendrímero de polipropiliminina hexadecamina Generación 3.0	Sigma aldrich, 469076	N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina	EvoBlock, KEMAM-003	PP1-(2-3-2)	27	
Dendrímero de polipropiliminina hexadecamina Generación 3.0	Sigma aldrich, 469076	Trietilentetramina	Sigma aldrich, 132098	PP1-(2-2-2)	27	
Dendrímero de polipropiliminina hexadecamina Generación 3.0	Sigma aldrich, 469076	N,N'-bis(2-aminopropil)-1,3-propanodiamina	Sigma aldrich, 404810	PP1-(3-3-3)	27	

**Ejemplo de producción VII:***Síntesis de lipídeos basados en N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina y 1-bromodecano*

5 Se mezclaron 100 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (0,623  $\mu\text{mol}$ ) con 10 ml de tetrahidrofurano (THF).  
 815,2  $\mu\text{l}$  de N,N-diisopropiletilamina (DIPEA) y 690,1 mg de 1-bromodecano (3,12  $\mu\text{mol}$ , (N-1) eq. donde N es una  
 cantidad 2x de aminas primarias más una cantidad 1x de aminas secundarias por oligo(alquilenamina)) y se mezcló  
 durante 22 h a temperatura ambiente con agitación constante. El producto se precipitó dos veces en n-hexano frío y  
 se disolvió en DCM. Los solventes se eliminaron por evaporación a 60°C. El lipídeo resultante se diluyó en etanol a  
 10 una concentración de 50 mg/ml y se almacenó a 4°C.

**Ejemplo de producción VIII:***Síntesis de lipídeos basados en N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina y N-dodecilacrilamida*

15 Se mezclaron 100 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (0,623  $\mu\text{mol}$ ) con 746,9 mg de N-dodecilacrilamida  
 (3,12  $\mu\text{mol}$ , (N-1) eq. donde N es una cantidad 2x de aminas primarias más una cantidad 1x de aminas secundarias  
 por oligo(alquilenamina)) y se mezcló durante 192 h a 90°C con agitación constante. El lipídeo resultante se diluyó  
 en etanol a una concentración de 50 mg/ml y se almacenó a 4°C.

20

**Ejemplo de producción IX:***Síntesis de lipídeos basados en N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina y acrilato de dodecilo*

25 Se mezclaron 100 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (0,623  $\mu\text{mol}$ ) con 750 mg de acrilato de dodecilo  
 (3,12  $\mu\text{mol}$ , (N-1) eq. donde N es una cantidad 2x de aminas primarias más una cantidad 1x de aminas secundarias  
 por oligo(alquilenamina)) y se mezcló durante 22 h a 90°C con agitación constante. El lipídeo resultante se diluyó en  
 etanol a una concentración de 50 mg/ml y se almacenó a 4°C.

**Ejemplo de producción X:***Síntesis de lipídeos basados en N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina y 1,2-epoxidodecano*

35 Se mezclaron 100 mg de N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (0,623  $\mu\text{mol}$ ) con 575,07 mg de 1,2-epoxidodecano  
 (3,12 mmol, (N-1) eq. donde N es una cantidad 2x de aminas primarias más una cantidad 1x de aminas secundarias  
 por oligo(alquilenamina)) y se mezcló durante 96 h a 80°C con agitación constante. El lipídeo resultante se diluyó en  
 etanol a una concentración de 50 mg/ml y se almacenó a 4°C.

**Ejemplo 1**

40

Ensayo de los polímeros catiónicos sobre su capacidad para transportar ARNm en diferentes líneas celulares

*Materiales y Métodos*

45 Formación de poliplejos:

Para la transfección *in vitro*, los poliplejos se formaron en un volumen de 44  $\mu\text{l}$ . Se mezclaron 22  $\mu\text{l}$  de agua para  
 inyección que contenía 1100 ng de ARNm (ARNm químicamente modificado que comprende el 25% de 5-metilcitosina  
 y 2-tiouridina, respectivamente) que codifica luciferasa de luciérnaga con 22  $\mu\text{l}$  de agua para inyección que contenía  
 50 la cantidad deseada de polímero. La proporción de polímero respecto a ARN se definió como nitrógeno de polímero  
 por grupo fosfato de ácido nucleico (N/P) y se ensayó usando cantidades constantes de ácido nucleico. Después de  
 mezclar el ácido nucleico con el polímero, las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se  
 usaron para transfección.

55 Transfección *in vitro* de poliplejos:

Los polímeros se han ensayado para la eficacia de transfección en 2 líneas celulares diferentes (NIH3T3 y A549). 24  
 h antes del tratamiento, 5.000 células (NIH3T3) o 7.000 células (A549) en 100  $\mu\text{l}$  de medio se sembraron en un pocillo  
 de una placa de 96 pocillos. El día de la transfección los poliplejos se formaron como se ha descrito. Para ensayar  
 60 diferentes cantidades de ARNm, se realizó una serie de diluciones mezclando el 50% de la solución de poliplejo con  
 la misma cantidad de medio (sin STF), tomando esta solución para realizar una etapa de dilución adicional similar,  
 etc., hasta que se alcanzó una concentración final de 62,5 ng/20  $\mu\text{l}$ . Se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de cada etapa de dilución a  
 las células sin intercambio de medio. 24 h después de la transfección el medio se eliminó. Las células se lisaron por  
 la adición de 100  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (Tris HCl 25 mM, Triton X100 al 0,1%, pH 7,8) e incubación durante 20 min a  
 65 temperatura ambiente. Se cargaron 80  $\mu\text{l}$  del lisado en un pocillo de una placa de 96 pocillos blanca y se usó para  
 medida de la actividad luciferasa en un Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer). Para este fin, se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de reactivo

de ensayo de luciferasa (D-luciferina 0,5 mM, coenzima A 0,3 mM, DTT 33 mM, ATP 0,5 mM, carbonato de magnesio 1 mM, sulfato de magnesio 2,7 mM, EDTA 0,1 mM, tricina 20 mM) y se determinó la quimioluminiscencia. Los experimentos se realizaron en triplicado.

## 5 *Resultados*

Como se muestra en la figura 1, los niveles de expresión de luciferasa varían extremadamente entre los diferentes polímeros modificados. Se pudieron alcanzar los niveles de transfección más eficaces en todos los tipos celulares usando PAA8k-(2-3-2) o PAA8k-(3-2-3), en contraste los polímeros modificados que contenían cadenas laterales de oligo(alquilenamina) donde una de las cadenas de alquilo está sustituida ((2-2-2) y (3-3-3)) o eliminada (2-2) la eficacia se reduce drásticamente en un factor de 10-1000. La elongación de las cadenas de alquilo en la oligo(alquilenamina) (3-43) también reduce la eficacia en un factor de 100.

## 15 **Ejemplo 2**

Formación de complejos y capacidad de unión a ARNm de PAA8k modificado con (2-3-2) y (3-2-3)

### *Materiales y Métodos*

20 Ensayo de migración en gel:

Los poliplejos se formaron como se describe en el ejemplo 1 a N/P 1, 2, 4, 8 y 12. Después de la incubación una muestra de 5 µl se mezcló con 5 µl de colorante de carga de ARN 2x (Fermentas) se incubó durante 10 min a 70°C y se cargó en un gel de agarosa al 1% que contenía bromuro de etidio. La migración en gel se realizó en tampón TBE a 150 V durante 30 min. Los ácidos nucleicos migrados se visualizaron por absorción de UV a 260 nm.

Ensayo RiboGreen:

30 Los poliplejos se formaron como se describe en el ejemplo 1 a N/P 1, 2, 4, 8 y 12. Después de la incubación muestras de 2 µl se mezclaron con 148 µl de agua y 50 µl de solución RiboGreen (1:200, kit de ensayo de ARN QuantiT Ribogreen, Invitrogen) en una placa de 96 pocillos blanca. Las muestras se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente con exclusión de luz y la fluorescencia se midió usando un Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer, 1 s, Ex: 485 nm, Em. 535 nm).

## 35 *Resultados*

La capacidad de los polímeros para interactuar con ácidos nucleicos para formar complejos estables es una característica crítica para un sistema de transporte eficaz. La interacción de los polímeros modificados con ARNm se analizó mediante migración en gel (figura 2) y ensayo RiboGreen (figura 3). Cuando el polímero es capaz de interactuar con el ácido nucleico, formando complejos estables, esto produce partículas de tamaño nanométrico e inversión de carga. Ambos efectos producen capacidad de migración obstaculizada durante la electroforesis en gel de agarosa. Como se muestra en la figura 2, PAA8k modificado con (2-3-2) o (3-2-3) produjo una ausencia/fuerte reducción del ARNm libre comparado con el control sin polímero (N/P 0), lo que indica una fuerte interacción. Esta unión es tan eficaz como el estándar de referencia PEI ramificado (brPEI).

45 Estos datos se pudieron confirmar usando el ensayo RiboGreen. En este ensayo una eficacia de unión aumentada produce una señal de fluorescencia reducida. Como se muestra en la figura 3 la reducción de la señal de fluorescencia es para PAA8k-(2-3-2) y -(3-2-3) tan fuerte como para brPEI. Por tanto, se generan complejos con una estabilidad similar.

## 50 **Ejemplo 3**

La eficacia de transfección es independiente del esqueleto del polímero

### 55 *Materiales y Métodos*

La formación de poliplejos se realizó según el ejemplo 1.

Transfección in vitro de poliplejos

60 Para la transfección in vitro y ensayo de eficacia de poliplejos se usaron células NIH3T3. 24 h antes del tratamiento 5.000 células en 100 µl de medio que contenía SFT al 10% se sembraron en un pocillo de una placa de 96 pocillos. El día de la transfección, el medio se intercambiaba frente a 100 µl de medio sin SFT. Los poliplejos se formaron como se ha descrito. Para ensayar diferentes cantidades de ARNm se añadieron 20 µl (500 ng), 10 µl (250 ng), 5 µl (125 ng) y 2,5 µl (62,5 ng) al medio. Después de 4 h de incubación a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% el medio se sustituyó por medio

fresco que contenía SFT al 10%. 24 h después de la transfección, el medio se eliminó. Las células se lisaron y analizaron como se describe en el ejemplo 1.

#### Resultados

5 Para confirmar que la capacidad para transportar ácidos nucleicos en las células usando polímeros modificados con (2-3-2) es independiente de la estructura del esqueleto, diferentes tipos de polímeros (además de poli(ácido acrílico), 8.000 Da, ejemplo 1) se han modificado con (2-3-2) en las condiciones descritas (tabla 1). Los resultados muestran que diferentes tipos de polímeros esqueleto (figura 4), así como diferente longitud de cadena (figura 5) producen expresión génica indicadora significativa, cuando se modifican con la oligo(alquilenamina) (2-3-2).

#### Ejemplo 4

Validación de la toxicidad celular de polímeros modificados con diferentes tipos de oligo(alquilenamina)s

##### Materiales y Métodos

20 Las transfecciones se realizaron según el ejemplo 3. La determinación de células vivas se realizó usando el ensayo de proliferación celular TACS MTT (Trevigen). Veinticuatro horas después de la transfección el medio se intercambié frente a 100 µl de medio fresco. Después de la adición de 10 µl de reactivo MTT, las células se incubaron durante 4 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Se añadieron 100 µl de reactivo detergente seguido por una etapa de incubación a temperatura ambiente durante la noche. La lectura se realizó por medida de absorción a 570 nm usando un Wallac Victor<sup>2</sup> (Perkin Elmer). Los resultados se presentan como el % de células vivas comparado a un control no tratado.

#### Resultados

25 Como se muestra en la figura 6 los diferentes polímeros modificados varían en términos de toxicidad celular. Mientras que las células tratadas con complejos que contenían poli(ácido acrílico) modificado con (2-3-2) y (3-2-3) muestran viabilidad aproximadamente del 100% (PAA8k-(2-3-2), PAA8k-(3-2-3), PAA20k-(2-3-2), PAA70k-(2-3-2)), otras alteraciones en el tipo de cadena lateral produjeron una fuerte toxicidad (PAA8k-(3-4-3), PAA8k-(3-3-3)) comparable al estándar tóxico (brPEI).

#### Ejemplo 5

35 Eficacia de transporte de ARN mensajero en ratones

##### Materiales y métodos

Animales:

40 Se obtuvieron ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad de Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Francia, y se mantuvieron en condiciones sin patógenos específicas. Los ratones se aclimataron al entorno del animalario durante al menos siete días antes de los experimentos. Todos los procedimientos animales fueron aprobados y controlados por el comité de ética local y se llevaron a cabo según las directrices de la ley alemana de protección de la vida animal.

Formación de poliplejos:

50 Los poliplejos se formularon como sigue: se diluyeron ARNm y PAA20k-(2-3-2) en 4,0 ml de agua doble destilada produciendo concentraciones de 500 µg/ml de ARNm y PAA20k-(2-3-2) a concentraciones correspondientes a N/P 10, 20, 30 o 40. La solución de ARNm se pipeteó a la solución de polímero, se mezcló pipeteando arriba y abajo, para dar una concentración final de ARNm de 250 µg/ml. Los complejos se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente antes del uso.

55 Diseño del dispositivo de aerosol.

60 Para el procedimiento de nebulización en un dispositivo de cuerpo entero, los ratones se colocaron en una caja de plástico de 9,8 × 13,2 × 21,5 cm que se puede sellar con una tapa. En un lado estrecho de la caja, se colocan cuatro agujeros pequeños como salida del aerosol. Mediante un agujero en el lado estrecho opuesto, la caja se conecta a través de una pieza conectora de 2,1 cm de diámetro a un cilindro de plástico de 15,4 cm de ancho × 41,5 cm de largo. La parte inferior del cilindro está cubierta homogéneamente con 150 g de gel de sílice (1-3 mm, #85330; Fluka, Suiza) para secar el aerosol que se produce por un nebulizador de chorro (PARI BOY® LC plus, PARI GmbH) conectado al otro extremo del cilindro. (Detalles descritos en Rudolph et al., J Gene Med. 2005, 7: 59-66).

65 Medida de la actividad Luc en pulmones de ratón usando imagenología bioluminiscente in vivo:

Veinticuatro horas después de la administración los ratones se sacrificaron por dislocación cervical. Después de abrir el peritoneo por incisiones en la línea media, los pulmones se diseccionaron de los animales y se perfundieron con PBS. Los pulmones se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se homogenizaron en estado congelado. Después de la adición de 400 µl de tampón de lisis (Tris HCl 250 mM, pH 7,8, Triton X-100 al 0,1%, comprimidos de mezcla de inhibidores de proteasas completos de Roche) e incubación durante 20 min en hielo, la actividad luciferasa en los sobrenadantes se midió usando un luminómetro de tubo Lumat LB9507 (EG&G Berthold, Múnich, Alemania).

#### Resultados

El experimento muestra que el ARNm se expresa de forma eficaz en las células pulmonares de ratones tras la administración por aerosol pulmonar como una combinación con PAA20k-(2-3-2), lo que indica que el polímero es capaz de transportar eficazmente al ARNm a las células pulmonares in vivo (cf. figura 7).

#### Ejemplo 6

Eficacia de transporte de ARN mensajero en cerdos

#### Materiales y Métodos

Formación de poliplejos:

Para la transfección in vivo los poliplejos se formaron en un volumen de 28 ml. 14 ml de agua para inyección que contenía 5,83 mg de ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga y 1,17 mg de ARNm que codifica β-galactosidasa y 14 ml de agua para inyección que contenía la cantidad deseada de polímero se prepararon y mezclaron mediante una bomba de jeringa de dos canales (KDS-210-CE; KD Scientific). Se llenaron dos jeringas de 20 ml usando la función de retirada del dispositivo. La mezcla se realizó conectando las jeringas a través de una pieza T (Discifix C 3SC, B.Braun) y uso de la función infusión del dispositivo de mezcla. La proporción de polímero respecto a ARNm se definió como nitrógeno de polímero por grupo fosfato del ácido nucleico (N/P) y se ensayó a N/P 10. Después de mezclar el ácido nucleico con el polímero las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente y se usaron 24 ml para nebulización. El volumen restante se usó para análisis fisicoquímico. El tamaño de partícula y el potencial zeta se determinaron usando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).

Procedimiento experimental de aplicación de aerosol a cerdos:

La sedación del cerdo se inició por premedicación con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido por inserción de una línea intravenosa a la vena auricular lateral. El cerdo se anestesió por inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según se requiera. La anestesia se mantuvo con infusión intravenosa continua de propofol al 1% según se requirió. Los parámetros de ventilación se hicieron coincidentes con el dióxido de carbono espiratorio final y se ajustaron si era necesario. Se siguieron la anestesia, parámetros respiratorios y cardiovasculares continuamente usando oximetría de pulso, capnografía, sonda de temperatura rectal y estado de reflejo. El cerdo recibió infusión de solución de electrolitos equilibrada a 10 ml/kg/h. La duración de la anestesia fue aproximadamente 80-120 min. El cerdo se mató con inyección en embolada de pentobarbital 100 mg/kg de peso corporal a través de la vena lateral de la oreja después de sedación después de que la aplicación del aerosol se completara (nebulizador en malla Aeroneb). Los pulmones se extirparon y cortaron se recogieron muestras de tejidos de aproximadamente 1 cm de espesor de varias regiones del pulmón seguido por incubación en medio de cultivo durante 24 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% en un incubador. Para la medida de la actividad luciferasa las muestras de tejido se incubaron en un baño de medio que comprendía el sustrato D-luciferina en PBS (100 µg/ml) a 37°C durante 30 min y se sometieron a imagenología bioluminiscente de luciferasa ex vivo (IVIS 100, Xenogen, Alameda, EE UU).

Microscopía electrónica de transmisión de poliplejos:

Para la microscopía electrónica de transmisión (MET) se usó una gotita de la mezcla producida para la aplicación de aerosol. La gotita se colocó en una rejilla (Plano GmbH, Wetzlar). Después de incubación durante 5 min, la gotita se eliminó usando un papel de filtro. La muestra se tiñó con una solución de acetato de uranilo y se analizó mediante un microscopio electrónico de transmisión (Jem 1011, Jeol).

#### Resultados

Como se muestra en la figura 8 PAA20k-(2-3-2) y ARNm a una proporción N/P de 10 produce complejos con un diámetro de complejo hidrodinámico por debajo de 100 nm y una carga de superficie (potencial zeta) de 40 mV. Ambos parámetros varían en el mismo tamaño que complejos basados en brPEI que ya se ha mostrado que transportan eficazmente ácidos nucleicos dentro de células in vivo. Las partículas muestran una forma redonda y un tamaño uniforme, cuando se analizaron por MET (figura 9). Como se muestra en la figura 10 estas partículas son capaces de administrar eficazmente ARNm (que codifica luciferasa de luciérnaga) en tejido pulmonar después de aplicación por

aerosol produciendo la expresión de la proteína diana. Los niveles de expresión fueron comparables a la nebulización de poliplejos formados con el estándar de referencia brPEI.

### Ejemplo 7

5 Estabilidad a liofilización de complejos

#### *Materiales y Métodos*

10 Preparación de muestras

Se formaron complejos PAA20k-(2-3-2)/ARNm (que codifica luciferasa de luciérnaga) como se describe en el ejemplo 1 en 4 viales diferentes a N/P 20 en un volumen de 1 ml. Un vial se usó sin tratamiento adicional para transfección, al segundo vial se añadieron 100 µl de solución de trehalosa al 11% para producir un volumen final de trehalosa al 1%. El tercer vial se liofilizó y rehidrató en 1 ml de agua. El cuarto vial se trató con 100 µl de trehalosa al 11% antes de la liofilización y también se rehidrató en 1 ml de agua.

Transfección:

20 24 h antes de la transfección 5.000 células NIH3T3 en 100 µl de medio se sembraron en una placa de 96 pocillos y se incubaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. El día de la transfección el medio se sustituyó frente a 100 µl de medio fresco sin SFT. Se añadieron 20, 10, 5 y 2,5 µl de cada solución de complejo a las células en triplicado produciendo transfección con 500, 250, 125 y 62,5 ng. 24 h después de la transfección el medio se eliminó, recogió y sustituyó por medio fresco. Esto se repitió después de 48 h y 72 h. El medio recogido se analizó para actividad luciferasa metridia. Para ese fin, se cargaron 50 µl de medio en una placa de 96 pocillos blanca, se mezclaron con 20 µl de solución de coelenteracina (coelenteracina 50 µM en tampón fosfato de sodio 50 mM) y la señal de quimioluminiscencia de medió usando un Wallac Victor2 (Perkin Elmer).

#### *Resultados*

30 Como se muestra en la figura 11 los complejos recientes producen expresión de luciferasa metridia después de 24 h. La expresión permanece estable durante 24 h adicionales y después disminuye lentamente. Este efecto no está influido negativamente por la adición de trehalosa, pero produce unos niveles de expresión ligeramente aumentados. Después de la liofilización los complejos sin tratar no son capaces de transfectar células lo que produce ausencia de expresión de la proteína indicadora. En contraste, la adición de trehalosa conserva el complejo y la eficacia de transfección resultante.

### Ejemplo 8 (No ilustrativo de la invención)

40 Uso de PAA8k-(2-3-2) y PAA8k-(3-2-3) como sistema de transporte para ADN de plásmido

#### *Materiales y Métodos*

Formación de poliplejos:

45 Los poliplejos se formaron como se describe en el ejemplo 1 usando ADN de plásmido (pCMVLuc, Plasmid Factory) que codifica luciferasa de luciérnaga en lugar de ARNm.

Transfección *in vitro* usando los poliplejos:

50 Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 3.

#### *Resultados*

55 En este experimento se analizó la eficacia de polímeros (poli(ácido acrílico) modificados con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2) en el transporte de ADN y expresión de proteína resultante en comparación con el estándar de referencia PEI ramificado (brPEI, figura 12). Los resultados muestran claramente que la transfección de células NIH3T3 con complejos compuestos de ADNp y polímeros modificados con oligo(alquilenamina) (2-3-2) y (3-2-3) producen un aumento significativo en la expresión de proteína indicadora. El nivel de expresión es incluso mayor que el del estándar de referencia.

### Ejemplo 9 (No ilustrativo de la invención)

65 Uso de PAA20k-(2-3-2) como sistema de transporte para ARNip para inducir interferencia de ARN

#### *Materiales y Métodos*

Los complejos se formaron como se describe en el ejemplo 1 usando ARNip GL3-Luc (Qiagen). Para la titulación de la cantidad de ARNip los complejos se diluyeron por etapas después de incubación de 30 min a temperatura ambiente. Para ese fin 22 µl de solución de complejo se mezclaron con 22 µl de medio sin SFT. 22 µl de esta dilución se mezclaron de nuevo con 22 µl de medio sin SFT. Esta serie de diluciones se repitió hasta que se alcanzó una concentración de ARNip de 7,8 ng por 20 µl. Se usaron 20 µl de cada etapa de dilución para la transfección como se describe en el ejemplo 1 usando células HeLa que expresan establemente luciferasa de luciérnaga (HeLa-Luc). Como control para la especificidad de una disminución basada en la interferencia de ARN de la expresión de luciferasa se usó un ARNip control que no influye la expresión celular (GFP22-ARNip; Qiagen) para transfección en las mismas condiciones. Los resultados se muestran como expresión de luciferasa relativa comparada con células control no tratadas.

#### Resultados

Como se muestra en la figura 13 el complejo ARNip GL3-Luc (Lucip) y PAA20k-(2-3-2) produce la disminución de la expresión de luciferasa. Este efecto es dependiente de la dosis (efecto reducido a menores cantidades de ARNip) y específico (sin efecto en ARNip inespecífico (GFPip)). A mayores proporciones N/P se pudo observar un efecto inespecífico adicional como se indica por la señal disminuida de células tratadas con GFPip.

#### Ejemplo 10

Eficacia de transporte de ARNm beneficiosa de estructuras de lipidoide basadas en oligo(alquilenamina) (2-3-2)

#### Materiales y Métodos

Formación de complejos lipidoide/ARNm

Los lipidoide se sintetizaron y diluyeron como se describe en el ejemplo de producción IV. Para la transfección 250 ng de ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga en 50 µl de agua se mezclaron en condiciones optimizadas con 4.000 ng de lipidoide en 50 µl de agua produciendo una proporción p/p (peso de lipidoide/peso de ARNm) de 16. Después de incubación de 30 min a temperatura ambiente las muestras se usaron para la transfección.

Transfección in vitro usando complejos lipidoide/ARNm

24 h antes del tratamiento 5.000 células NIH3T3 en 100 µl de medio se sembraron en un pocillo de una placa de 96 pocillos. El día de la transfección los complejos se formaron como se ha descrito. Para ensayar diferentes cantidades de ARNm se realizó una serie de diluciones mezclando el 50% de la solución del complejo con la misma cantidad de medio (sin SFT), tomando esta solución para realizar una etapa de dilución adicional similar, etc. hasta que se alcanzó una concentración de 15,6 ng/50 µl. Antes de la transfección el medio se eliminó de las células y se sustituyó por 100 µl de medio sin SFT. Se añadieron 50 µl de cada etapa de dilución a las células y se incubaron durante 4 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Después de eso el medio se sustituye otra vez con medio fresco que contiene SFT al 10%. 24 h después de la transfección el medio se eliminó. Las células se lisaron y los lisados se analizaron para actividad de proteína indicadora como se describe en el ejemplo 1.

#### Resultados

Como se muestra en la figura 14 los lipidoide basados en la estructura (2-3-2) producen mayor nivel de expresión de luciferasa de luciérnaga que estructuras similares basadas en (2-2-2) o (3-3-3). Este efecto se pudo demostrar independientemente de la cadena de alquilo unida (C12 o C14). Como la actividad de la luciferasa de luciérnaga se correlaciona con su nivel de expresión en la célula en por lo tanto la eficacia del transporte de ARNm en la célula, estos resultados muestran que los lipidoide basados en (2-3-2) transportan ARNm más eficaz en células in vitro.

#### Ejemplo 11

Eficacia de transporte de ARN mensajero de formulaciones de lipidoide en ratones después de la administración intravenosa

#### Materiales y Métodos

Animales:

Se obtuvieron ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad de Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Francia, y se mantuvieron en condiciones sin patógenos específicas. Los ratones se aclimataron al entorno del animalario durante al menos siete días antes de los experimentos. Todos los procedimientos animales fueron aprobados y controlados por el comité de ética local y se llevaron a cabo según las directrices de la ley alemana de protección de la vida animal.

## Formulaciones de lipidoideas:

Los lipidoideas se formularon con ARNm como sigue: C12-(2-3-2), DOPE, Col y DSPE-PEG2k (proporción en peso 3,6:0,18:0,76:1) se disolvieron en etanol y se inyectaron rápidamente en una solución tamponada con citrato (ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 4,5) que comprendía ARNm químicamente modificado que codifica luciferasa de luciérnaga a una proporción en peso lípido/ARNm de 10,5 para dar una concentración final de etanol del 20% y se dializó frente a agua. Los complejos lipidoide/ARNm resultantes produjeron nanopartículas cargadas positivamente (92,6 ± 0,7 nm; 21,0 ± 0,2 mV) y se inyectaron por vía intravenosa en la vena de la cola de ratones inmovilizados. En un segundo experimento, los complejos lipidoide/ARNm se ajustaron a PBS antes de la inyección intravenosa que produjo nanopartículas casi sin carga (91,5 ± 0,6 nm; -0,7 ± 0,2 mV).

## Medida de la actividad Luc en ratones usando imagenología bioluminiscente in vivo:

Veinticuatro horas tras la administración los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de medetomidina (11,5 µg/kg PC), midazolam (115 µg/kg PC) y fentanilo (1,15 µg/kg PC). Se aplicó sustrato D-luciferina (3 mg/100 µl de PBS por ratón) a través de inyección intraperitoneal. La bioluminiscencia se midió 10 minutos después, usando un sistema de imagenología IVIS 100 (Xenogen, Alameda, EE UU) y los ajustes de cámara: Bin(HS), campo de visión 10, f1 f-stop, agrupación de alta resolución y tiempo de exposición de 5 min. La señal se cuantificó y analizó usando el Software Living Image versión 2.50 (Xenogen, Alameda, EE UU).

*Resultados*

El experimento muestra que el ARNm se expresa eficazmente en la región abdominal de los ratones solo cuando los complejos lipidoide/ARNm se formularon en PBS portando una carga casi neutra, pero no cuando se formularon en agua (cf. figura 16).

**Ejemplo 12**

Eficacia de transporte de ARN mensajero de formulaciones de lipidoideas en ratones a diferentes órganos después de la administración intravenosa

*Materiales y métodos*

Animales:

Se obtuvieron ratones BALB/c hembras de seis a ocho semanas de edad de Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Francia, y se mantuvieron en condiciones sin patógenos específicas. Los ratones se aclimataron al entorno del animalario durante al menos siete días antes de los experimentos. Todos los procedimientos animales fueron aprobados y controlados por el comité de ética local y se llevaron a cabo según las directrices de la ley alemana de protección de la vida animal.

## Formulaciones de lipidoideas:

Los lipidoideas se formularon con ARNm como sigue: lipidoide, DOPE, Col y DMPE-PEG2k (proporción molar 8:6:5:1) se disolvieron en etanol y se inyectaron rápidamente en una solución tamponada con citrato (ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, pH = 4,5) que comprendía ARNm químicamente modificado que codifica luciferasa de luciérnaga a una proporción N/P de 15 para dar una concentración final de etanol del 20% y se dializó frente a agua. Los complejos lipidoide/ARNm resultantes produjeron nanopartículas cargadas positivamente. Los complejos lipidoide/ARNm se ajustaron a PBS antes de la inyección intravenosa lo que produjo nanopartículas casi sin carga (véase la tabla 5).

**Tabla 5**

	C12-(2-3-2)		C14-(2-3-2)		C16-(2-3-2)	
	agua	PBS	agua	PBS	agua	PBS
<b>tamaño (nm)</b>	84,3 ± 0,7	84,9 ± 0,7	85,3 ± 0,6	86,6 ± 0,5	125,7 ± 0,2	120,6 ± 1,2
<b>zeta (mV)</b>	11,1 ± 0,1	-0,9 ± 0,9	9,2 ± 0,2	-0,7 ± 0,2	8,6 ± 0,2	1,0 ± 0,2

Medida de la actividad Luc en ratones usando imagenología bioluminiscente in vivo:

Veinticuatro horas tras la administración los ratones se anestesiaron por inyección intraperitoneal de medetomidina (11,5 µg/kg PC), midazolam (115 µg/kg PC) y fentanilo (1,15 µg/kg PC). Se aplicó sustrato D-luciferina (3 mg/100 µl de PBS por ratón) a través de inyección intraperitoneal. La bioluminiscencia se midió 10 minutos después, usando un sistema de imagenología IVIS 100 (Xenogen, Alameda, EE UU) y los ajustes de cámara: Bin(HS), campo de visión 10, f1 f-stop, agrupación de alta resolución y tiempo de exposición de 30 s. La señal se cuantificó y analizó usando el

Software Living Image versión 2.50 (Xenogen, Alameda, EE UU). Posteriormente, los órganos se diseccionaron y se hicieron imágenes por separado otra vez.

*Resultados*

5 El experimento muestra que el ARNm se expresa eficazmente en la región abdominal de los ratones y aumentó al disminuir la longitud de la cadena de alcano (cf. Figura 17 A, B). Además, el experimento mostró que la administración de ARNm al hígado disminuyó al aumentar la longitud de la cadena de alcano de los lipídeos (C16<C14<C12) y apenas era detectable para C16. La expresión de luciferasa en bazo fue mayor para C14. Se observó alguna expresión de luciferasa en los pulmones, pero no se observó ninguna en corazón, riñón, estómago o cerebro (cf. figura 18 A, B).

**Ejemplo 13**

15 Comparación de la eficacia de diferentes reactivos de transfección en su capacidad para administrar ADNp y ARNm

*Materiales y Métodos*

Formación de poliplejos:

20 Los poliplejos se formaron como se describe en el ejemplo 1 usando ADN de plásmido (PCMVLuc, Plasmid Factory) que codifica luciferasa de luciérnaga o ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga.

Transfección in vitro usando poliplejos:

25 Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 3.

*Resultados*

30 El experimento se realizó para demostrar si la eficacia de transfección está relacionada exclusivamente con el medio de transfección (polímero/lípidoide) o también con el tipo de ácido nucleico. Los resultados (figura 19) muestran claramente que los reactivos de transfección que transportan ADNp eficazmente, no son necesariamente vehículos eficaces para el transporte de ARNm. Por tanto, un sistema transportador con una alta eficacia de transfección para ADNp no permite una predicción de eficacia para ARNm.

**Ejemplo 14**

Comparación de la eficacia de transfección de PAA8k, modificado con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-propanodiamina (2-3-2) o N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-butanodiamina (2-4-2)

*Materiales y Métodos*

Formación de poliplejos:

40 Los poliplejos se formaron como se describe en el ejemplo 1.

45 Transfección in vitro usando poliplejos:

Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 3.

*Resultados*

50 Para investigar adicionalmente si la eficacia de los polímeros modificados con (2-3-2) está fuertemente relacionada con la estructura (2-3-2) o muestra eficacia similar para cualquier otra estructura 2-X-2, con X > 2, PAA8k se modificó con N,N'-bis(2-aminoetil)-1,3-butanodiamina (2-4-2). La comparación con PAA8k-(2-3-2) con PAA8k-(2-4-2) (figura 20) muestra que ambos polímeros produjeron niveles de expresión de luciferasa altos casi idénticos después de la transfección de ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga. Esto demuestra que un polímero modificado con la estructura (2-X-2), con X > 2, en general produce un reactivo de transfección con una eficacia de transporte de ARNm mejorada comparada con la modificación de otras oligo(alquilamina)s:

**Ejemplo 15**

Microscopía electrónica de transmisión de formulaciones de lipídeos

*Materiales y Métodos*

65 Formulación de lipídeos:

Los lipídeos se formularon con ARNm como sigue: C10-(2-3-2), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) o 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), colesterol y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxipoli(etilenglicol)-2000] (DSPE-PEG2k) o 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol, metoxipoli(etilenglicol) (DPG-PEG2k) (proporción molar 9:6:5:1) se disolvieron en etanol y se inyectaron rápidamente en una solución tamponada con citrato (ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,5) que comprendía ARNm químicamente modificado que codifica luciferasa de luciérnaga en una proporción molar nitrógeno de lípido/fosfato de ARNm de 17 para dar una concentración final de etanol del 20% y se dializaron frente a agua durante 24 h.

#### 10 Microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis de tamaño, se usó MET (microscopía electrónica de transmisión) con aumentos de 10.000 y 60.000. Como una primera etapa, placas basadas en cobre (Plano GmbH; S162-3) se limpiaron con plasma. Después de este tratamiento 8 µl de formulación de lipídeo se pusieron en contacto con una placa de cobre durante 3 min. Después de eliminar la gotita de formulación de lipídeo la muestra se tiñó poniendo en contacto la placa de cobre cargada con el lipídeo con una gota de 8 µl de solución de acetato de uranilo dos veces durante 30 s. Después de cada etapa los líquidos se eliminaron retirándolos con un papel de transferencia. Por último, las placas portadoras se secan a temperatura ambiente durante 30 min más y se analizan mediante un Jem1011 (Jeol).

#### 20 *Resultados*

Las imágenes de MET (figura 21) muestran que las formulaciones lipídeo formadas son partículas esféricas con una distribución de tamaño homogénea (vista general). En la imagen ampliada el tamaño de estas partículas se puede estimar en 60-80 nm.

#### 25 **Ejemplo 16**

Eficacia de transporte de ARNm de C10-(2-3-2) sintetizado a través de un haluro de alquilo.

#### 30 *Materiales y Métodos*

Síntesis:

La síntesis de C10-(2-3-2) se realizó como se describe en el ejemplo de producción VII.

#### 35 *Formulación de lipídeos:*

Los complejos lipídeo/ARNm se formaron como se describe en el ejemplo 15 usando C10-(2-3-2), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), colesterol y 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-metoxipoli(etilenglicol) (DPG-PEG2k) en una proporción molar de 9:6:5:1 y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a N/P 17.

Transfección in vitro:

24 h antes de la transfección 5.000 células NIH3T3 en 100 µl de medio se sembraron en un pocillo de una placa de 96 pocillos. El día de la transfección las formulaciones de lipídeos se formaron como se ha descrito y se ajustaron a PBS 1x con una solución de PBS 10x. Las formulaciones de lipídeos se diluyeron para producir 500 ng, 250 ng o 125 ng en 50 µl, se añadieron a las células y se incubaron durante 24 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. 24 h después de la transfección el medio se eliminó. Las células se lisaron y los lisados se analizaron para actividad de proteína indicadora como se describe en el ejemplo 1.

#### 50 *Resultados*

Como se muestra en la figura 22 C10-(2-3-2) sintetizado a través de un haluro de alquilo es capaz de transportar ARNm en una célula produciendo expresión de la proteína indicadora luciferasa.

#### 55 **Ejemplo 17**

Eficacia de transporte de ARNm de C12-(2-3-2) sintetizado a través de N-dodecilacrilamida.

#### 60 *Materiales y métodos*

Síntesis:

La síntesis de C12-(2-3-2) se realizó como se describe en el ejemplo de producción VIII.

#### 65 *Formulación de lipídeos:*

Los complejos lipidoide/ARNm se formaron como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), colesterol y 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-metoxipolietilenglicol (DPG-PEG2k) en una proporción molar de 9:6:5:1 y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a N/P 17.

5 Transfección in vitro:

Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 16 usando una dosis de ARNm de 500, 250 o 125 ng por pocillo.

10 *Resultados*

Como se muestra en la figura 23 C12-(2-3-2) sintetizado a través de N-dodecilacrilamida es capaz de transportar ARNm en una célula produciendo expresión de la proteína indicadora luciferasa.

15 **Ejemplo 18**

Eficacia de transporte de ARNm de C12-(2-3-2) sintetizado a través de acrilato de dodecilo.

20 *Materiales y métodos*

La síntesis de C12-(2-3-2) se realizó como se describe en el ejemplo de producción IX.

25 Formulación de lipidoide:

Los complejos lipidoide/ARNm se formaron como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), colesterol y 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-metoxipolietilenglicol (DPG-PEG2k) en una proporción molar de 9:6:5:1 y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a N/P 17.

30 Transfección in vitro:

Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 16 usando una dosis de ARNm de 500, 250 o 125 ng por pocillo.

35 *Resultados*

Como se muestra en la figura 24 C12-(2-3-2) sintetizado a través de acrilato de dodecilo es capaz de transportar ARNm en una célula produciendo expresión de la proteína indicadora luciferasa.

40 **Ejemplo 19**

Eficacia de transporte de ARNm de C12-(2-3-2) formulado usando diferentes lípidos auxiliares y diferentes proporciones de lipidoide respecto a ARNm (N/P).

45 *Materiales y métodos*

Formulación de lipidoide:

50 Los complejos lipidoide/ARNm se formaron como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2) en combinación con 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-metoxipolietilenglicol (DMG-PEG2k) como PEG-lípido, DOPE o DSPC como lípidos auxiliares y proporción N/P 17 o 18.

Transfección in vitro:

55 Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 16 usando una dosis de ARNm de 250 ng por pocillo.

*Resultados*

60 Como se muestra en la figura 25 C12-(2-3-2) es capaz de transportar ARNm dentro de una célula produciendo expresión de gen indicador de luciferasa en combinación con diferentes lípidos auxiliares (DOPE, DSPC) y a diferentes proporciones N/P (17 o 18). Por tanto, C12-(2-3-2) transporta eficazmente ARN dentro de células independientemente del lípido auxiliar y la proporción N/P.

65 **Ejemplo 20**

Eficacia de transporte de ARNm mejorada en ratones después de administración intravenosa de la formulación de lipidoide con C12-(2-3-2) comparado con C12-(2-2-2) y C12-(3-3-3)

*Materiales y métodos*

5

Animales:

Como se describe en el ejemplo 11.

10 Formulaciones de lipidoide:

Como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), 1,2-dioleil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), colesterol, 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-metoxipolietilenglicol (DMG-PEG2k) y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a N/P 17.

15 Medida de la actividad Luc en ratones usando imagenología bioluminiscente in vivo:

Como se describe en el ejemplo 11, anestesiando los animales 6 h después de la administración.

*Resultados*

20

Como se muestra en la figura 26 la formulación de lipidoide donde se incluye C12-(2-3-2) produce expresión del gen indicador significativamente aumentada en ratones comparado con C12-(3-3-3) y C12-(2-2-2). Esto demuestra la capacidad de transporte de ARNm beneficiosa de C12-(2-3-2).

**Ejemplo 21**

Comparación de eficacia de transporte de ARNm de oligo(alquilenamina) (2-3-2) saturada con diferentes cantidades de cadena de alquilo C12.

30 *Materiales y métodos*

Formulación de lipidoide:

35 Como se describe en el ejemplo 15 sin diálisis usando oligo(alquilamina) (2-3-2) con diferentes grados de modificación y posiciones (véase la figura 27 A, SynCom).

Transfección in vitro:

40 Los experimentos de transfección se realizaron como se describe en el ejemplo 16 usando una dosis de ARNm de 250 ng por pocillo.

*Resultados*

45 Como se muestra en la figura 27 A se sintetizaron tres versiones diferentes de C12-(2-3-2) para evaluar la influencia de la cantidad y posición de cadenas de alquilo por oligo(alquilenamina) en la capacidad de transporte de ARNm. La eficacia de transfección (figura 27 B) no muestra diferencias en la expresión de proteína indicadora demostrando que no se pueden observar diferencias en la eficacia de transporte de ARNm. Por tanto, diferentes tipos de formulaciones de lipidoide C12-(2-3-2) transportan ARNm con la misma eficacia.

**Ejemplo 22**

Liofilización de formulaciones de lipidoide

*Materiales y métodos*

55

Formulación de lipidoide:

Como se describe en el ejemplo 15.

60 Proceso de liofilización:

65 Se prepararon soluciones protectoras de trehalosa, sacarosa y lactosa en agua (c: 20% p/v). Se prepararon diluciones en serie con un factor de 2 produciendo soluciones protectoras desde el 20% hasta el 0,625% (p/v). A estas soluciones se añadió el mismo volumen de formulación de lipidoide y se mezcló pipeteando. Las soluciones se congelaron en nitrógeno líquido y se liofilizaron usando un sigma alfa 1-4 (Martin Christ). Después de la liofilización las partículas se

resuspendieron en el mismo volumen de agua y se usaron para análisis. Como control se mezclaron lipoplejos con soluciones protectoras a las mismas concentraciones sin congelación y liofilización.

Transfección in vitro:

5 Como se describe en el ejemplo 15 usando 233 ng de ARNm por pocillo.

Medida del tamaño:

10 El diámetro hidrodinámico de las partículas se midió usando un ZetaSier Nano ZS (Malvern).

#### *Resultados*

15 Como se muestra en la figura 28 todos los azúcares ensayados fueron capaces de mantener el tamaño de partícula y la eficacia de transfección a diferentes concentraciones. En comparación, partículas sin protector (0%) se volvieron menos eficaces y aumentaron fuertemente de tamaño debido a procesos de agregación.

#### **Ejemplo 23**

20 Transporte de ARN en tejido de mamífero *ex vivo*

#### *Materiales y métodos*

Formulación de lipoides:

25 Como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), DOPE, colesterol, DPG-PEG2k y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a una proporción N/P de 17 sin diálisis.

Tratamiento de las muestras de tejido:

30 Se tomaron trozos de tejido (músculo, grasa, arteria o pulmón; véase la tabla) de aprox. 1 cm<sup>3</sup> de un animal recién muerto (cerdo u oveja; véase la tabla) y se lavaron en PBS. En cada trozo de tejido se inyectaron 100 µl de formulación de lipidoide que contenía 10 µg de ARN o 200 µl de formulación de lipidoide que contenía 20 µg de ARN (véase tabla). En el caso del tratamiento de la arteria de oveja, las formulaciones de lipidoide se inyectaron en la luz del vaso que se cerró en ambos extremos mediante un hilo. El tejido se cultivó durante 24 h en medio de cultivo (DMEM) que contenía SFT al 10%.

Análisis de la expresión de luciferasa:

40 Después de 24 h las muestras se incubaron en PBS que contenía luciferina (100 µg/ml) durante 30 min. La actividad luciferasa se midió usando un sistema de imagenología in vivo (IVIS, Perkin Elmer).

#### *Resultados*

45 Como se muestra en la figura 29 C12-(2-3-2) permitió el transporte de ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga en células de una variedad de diferentes tejidos de diferentes especies produciendo la expresión de luciferasa. En contraste, las muestras no tratadas (D, E, trozo de tejido inferior) no muestran una señal de imagenología.

#### **Ejemplo 24**

50 Expresión de enzima convertidora de angiotensina I 2 (ACE-2) in vitro

Formulación de lipoides:

55 Como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), DOPE, colesterol, DPG-PEG2k sin la adición de ARNm, lo que produce lipoplejos vacíos. La formulación de complejos de lipidoide y ARNm se realizó a través de carga posterior. Para este fin 1 µl de ARNm que codifica ACE-2 (1 mg/ml) se mezcló con 4 µl de la solución que contenía el lipolejo y se incubó durante 10 min a temperatura ambiente.

60 Transfección in vitro de células:

65 Para la transfección in vitro 300.000 células HepG2 se sembraron en un pocillo de una placa de 6 pocillos 24 h antes del tratamiento en 2 ml de medio que contenía SFT al 10%. El día de la transfección el medio se intercambiaba frente a 2 ml de medio fresco. Las formulaciones de lipoides se prepararon como se ha descrito y se añadieron 2,5 µl que contenían 500 ng de ARNm a cada pocillo. En los pocillos control se inyectó la misma cantidad de formulación de lipidoide sin la adición de ARNm durante la formulación.

Detección de la expresión de ACE-2 por inmunotransferencia:

5 24 h después de la transfección el medio se eliminó y las células se lavaron con 1 ml de PBS. Las células se lisaron durante 10 min en hielo usando 250 µl de tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, TritonX al 0,1%, pH 7,4). Después de raspar los lisados, los restos celulares se eliminaron por centrifugación durante 10 min a 14.000 rpm.

10 Después de la estimación de la proteína (ensayo BCA, Thermo-Fisher scientific) se cargaron 10 µg por carril en un gel de SDS-PAGE al 10% (Thermo-Fisher scientific). Después de la electroforesis a 100 V durante 1,5 h el gel se transfirió a una membrana de PVDF (TransBlot Turbo, Biorad).

15 Después de transferir la membrana se bloqueó usando leche en polvo al 5% en TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,5, Tween20 al 0,1%) durante 30 min. Después de bloquear la membrana se ensayó con un anticuerpo anti-ACE2 (R&D systems) a una dilución de 1:10.000 a 4°C durante la noche. Después de tres etapas de lavado (10 min, TBS-T cada una) la membrana se ensayó usando un anticuerpo anti-cabra-HRP (SCBT) a una dilución 1:10.000 durante 1 h a temperatura ambiente, seguido por tres etapas de lavado (10 min, TBS-T cada una). Las señales se desarrollaron usando un sustrato de HRP luminiscente (GE healthcare) y las señales se analizaron usando una cámara (ChemiDoc XRS+, Bio-Rad). Después de la detección de señales de AEC2 se analizó igual carga usando un anticuerpo anti-GAPDH (NEB) a una dilución 1:10.000 durante 4 h a temperatura ambiente.

20 *Resultados*

25 En la figura 30 se muestra el resultado de la inmunotransferencia de la transfección. Los dos carriles izquierdos muestran los lisados de células tratadas, los dos carriles de la derecha el lisado de células sin tratar. Como se demuestra claramente, la expresión de ACE-2 solo se puede observar en muestras que se trataron con formulaciones de lipídoides tras carga con ARN que codifica ACE-2. Este experimento muestra que el ARNm de ACE-2 también se puede transportar mediante formulación de lipidoide que contiene C12-(2-3-2). También demuestra que el método de carga posterior de lipoplejos vacíos también produce transporte eficaz de ARNm dentro de las células.

### 30 **Ejemplo 25**

Expresión de eritropoyetina murina (mEPO) en ratones Balb/c

35 *Materiales y métodos*

Formulación de lipídoides:

40 Como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), DOPE, colesterol, DMPE-PEG2k y ARNm que codifica eritropoyetina murina (mEPO) a una proporción N/P de 15.

Animales:

Como se describe en el ejemplo 11.

45 Tratamiento de los animales:

50 La formulación de lipidoide se ajustó a PBS 1x y se diluyó para producir 5, 10 y 20 µg de ARNm en 130 µl cada una. Se trataron tres ratones por dosis por inyección intravenosa. Como control se trataron ratones con PBS. 6 h después del tratamiento se sacó sangre y se analizaron los niveles de EPO murina.

Cuantificación de EPO murina:

55 La cuantificación de EPO murina se realizó mediante un ELISA de EPO de ratón (Quantikine ELISA, R&D Systems Inc.) según el protocolo del fabricante.

*Resultados*

60 En este experimento la expresión de eritropoyetina murina en ratones después del tratamiento con ARNm de EPO murina formulado en una formulación de lipidoide que contiene C12-(2-3-2). Como se demuestra en la figura 31 se pudo detectar EPO murina después de 6 h en todos los grupos en concentraciones significativamente mayores que el grupo control tratado con PBS. Por tanto, el ARNm de EPO murina se transportó eficazmente dentro de células lo que produce expresión de la proteína.

### 65 **Ejemplo 26**

Eficacia de transporte de ARN mensajero de polímero lineal poli(alilamina) modificado con oligo(alquilenamina) (2-3-2)

*Materiales y métodos*

5 Formación de poliplejos:

Como se describe en el ejemplo 1 usando poli(alilamina) (PALAM) modificada con oligo(alquilenamina) (2-3-2), (2-2-2) o (3-3-3). Síntesis véase ejemplo de producción V.

10 Transfección in vitro de poliplejos:

Como se describe en el ejemplo 1, transfectando células NIH3T3, usando 500 ng de ARNm y N/P 12.

15 **Resultados**

Como se muestra en la figura 32 después de la transfección con poliplejos de ARNm y PALAM-(2-3-2) las células muestran una expresión de luciferasa significativamente mayor que después de la transfección con complejos PALAM-(2-2-2)/ARNm o PALAM-(3-3-3)/ARNm. Por tanto, estos resultados demuestran que la modificación de un polímero lineal, terminado en amina con una oligo(alquilenamina) con cadenas alquilo alternantes produce el mismo efecto beneficioso que sobre un esqueleto de polímero lineal, terminado en carboxilo.

**Ejemplo 27**

25 Eficacia de transporte de ARN mensajero de polímero dendrítico polipropilenimina modificado con oligo(alquilenamina) (2-3-2)

*Materiales y métodos*

30 Formación de poliplejos:

Como se describe en el ejemplo 1 usando polipropilenimina (PPI) modificada con oligo(alquilenamina) (2-3-2), (2-2-2) o (3-3-3). Síntesis véase ejemplo de producción VI.

35 Transfección in vitro de poliplejos:

Como se describe en el ejemplo 1, transfectando células NIH3T3, usando 500 ng de ARNm y N/P 32.

*Resultados*

40 Como se muestra en la figura 33 después de la transfección con poliplejos de ARNm y PPI-(2-3-2) las células muestran una expresión de luciferasa significativamente mayor que después de la transfección con complejos PPI-(2-2-2)/ARNm o PPI-(3-3-3)/ARNm. Por tanto, estos resultados demuestran que la modificación de un polímero dendrítico con una oligo(alquilenamina) con cadenas alquilo alternantes produce el mismo efecto beneficioso que sobre un esqueleto de polímero lineal.

**Ejemplo 28**

50 Eficacia de transporte de ARN intracelular de la formulación de C12-(2-3-2) después de inyección subcutánea en ratas

*Materiales y métodos*

Formulación de lipidoideas:

55 Como se describe en el ejemplo 15 usando C12-(2-3-2), DOPE, colesterol, DMPE-PEG2k y ARNm que codifica luciferasa de luciérnaga a una proporción N/P de 17.

Tratamiento de los animales:

60 La formulación de lipidoide se ajustó a PBS 1x. Se inyectaron 500 µl de la formulación que contenían 63 µg de ARN por vía subcutánea a ratas Buffalo hembra. 6 h después de la administración la rata se anestesió por inyección intraperitoneal de medetomidina (11,5 µg/kg PC), midazolam (115 µg/kg PC) y fentanilo (1,15 µg/kg PC). Se aplicó sustrato D-luciferina (30 mg en PBS por ratón) por inyección intraperitoneal. La bioluminiscencia se midió 10 min después, usando un sistema de imagenología IVIS 100 (Xenogen, Alameda, EE UU).

65 *Resultados*

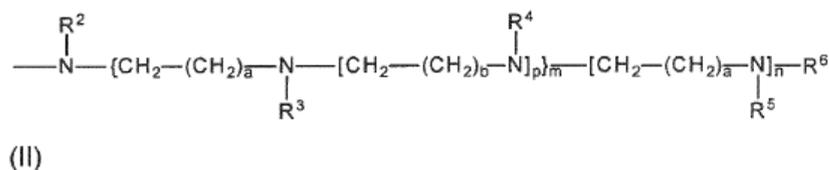
Como se demuestra en la figura 34 la rata muestra una señal de luminiscencia brillante en el lado de la inyección lo que demuestra que el transporte del ARN en el tejido circundante era muy eficaz. También muestra que la funcionalidad del ARN permanece intacta ya que se puede producir la proteína codificada.

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un ARN monocatenario y un componente que comprende una oligo(alquilenamina), componente que se selecciona de:

a) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (II) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal:



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (II) en una pluralidad de tales grupos:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

p es 1 o 2,

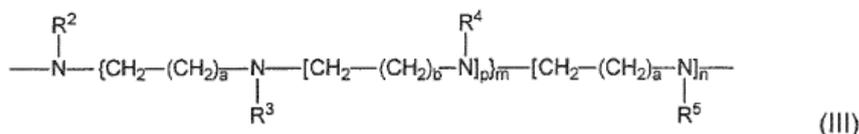
m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; y una cadena de poli(etilenglicol);

R<sup>6</sup> se selecciona de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor,

y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II);

b) un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (III) como unidades repetitivas:



en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (III) en una pluralidad de tales grupos:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

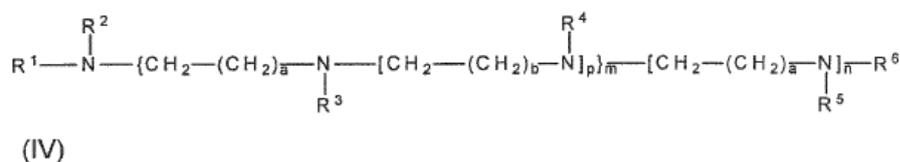
p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup> en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alquenilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; y una cadena de poli(etilenglicol);

y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III); y

c) un lipidoide que tiene la estructura de fórmula (IV):



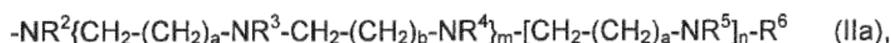
en donde las variables a, b, p, m, n y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como sigue:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,  
 p es 1 o 2,  
 m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m + n es ≥ 2; y

R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup>, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueniilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH<sub>2</sub>; una cadena de poli(etilenglicol); y un ligando de receptor; siempre que al menos dos residuos entre R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> sean un grupo -CH<sub>2</sub>-CH(OH)-R<sup>7</sup>, -CH(R<sup>7</sup>)-CH<sub>2</sub>-OH, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-O-R<sup>7</sup>, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-(C=O)-NH-R<sup>7</sup> o -CH<sub>2</sub>-R<sup>7</sup>, en donde R<sup>7</sup> se selecciona de alquilo de C3-C18 o alqueniilo de C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IV) pueden estar protonados para proporcionar un lipioide catiónico de fórmula (IV).

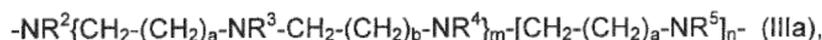
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende el ARN monocatenario y el componente que comprende una oligo(alquilenamina) seleccionada de los componentes a) y b), en donde

el componente a) es un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (IIa) como una cadena lateral y/o como un grupo terminal:



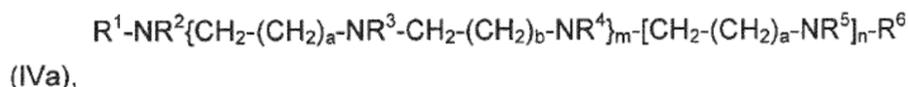
en donde a, b, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la reivindicación 1, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIa) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónico; y

el componente b) es un oligómero o polímero que comprende una pluralidad de grupos de fórmula (IIIa) como unidades repetitivas:



en donde a, b, m, n y R<sup>2</sup> a R<sup>5</sup> se definen como en la reivindicación 1, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IIIa) pueden estar protonados para proporcionar una estructura de oligómero o polímero catiónico.

3. La composición de la reivindicación 1, que comprende el ARN monocatenario y un lipioide que tiene la estructura de fórmula (IVa):



en donde a, b, m, n y R<sup>1</sup> a R<sup>6</sup> se definen como en la reivindicación 1, y en donde uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (IVa) pueden estar protonados para proporcionar un lipioide catiónico.

4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, en la fórmula (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) o (IVa) n es 1.
5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, en la fórmula (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) o (IVa) m es 1 y n es 1.
6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde, en la fórmula (II), (IIa), (III), (IIIa), (IV) o (IVa) a es 1 y b es 2 o a es 2 y b es 1.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el oligómero, polímero o lipioide es un oligómero, polímero o lipioide catiónico, y en donde el oligómero, polímero o lipioide catiónico forma un complejo con el ARN monocatenario.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que está en forma liofilizada y que comprende además un lioprotector.
9. La composición de la reivindicación 8, en donde el lioprotector es trehalosa.
10. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el ARN monocatenario es ARNm.

11. Una composición farmacéutica que comprende una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.
12. Uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para administrar ARN monocatenario a una célula in vitro.
- 5 13. Un método in vitro para administrar ARN monocatenario a una célula o tejido diana que comprende la etapa de poner en contacto una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 con la célula o tejido diana.
- 10 14. Una composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para uso en terapia génica.

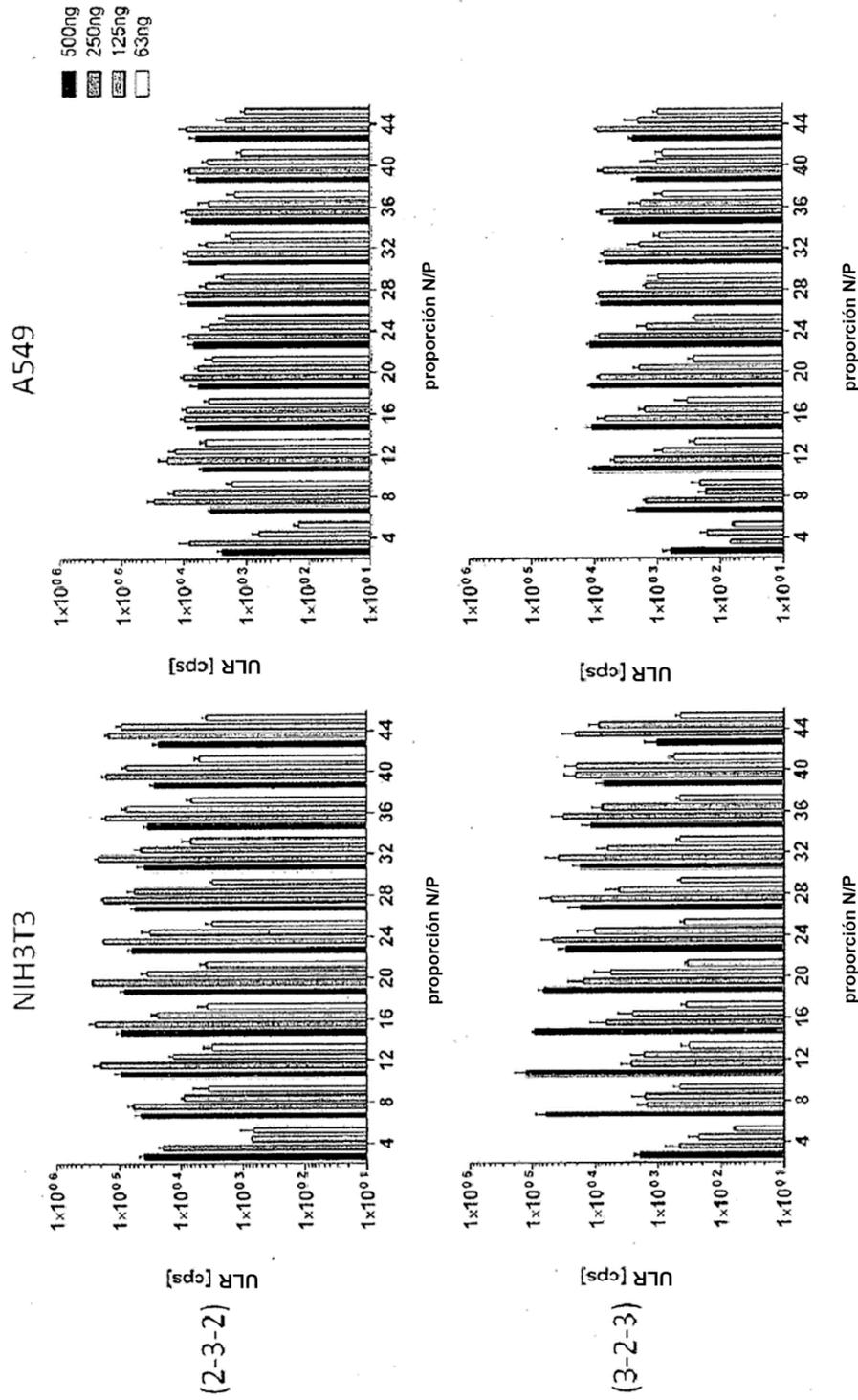


Figura 1 (Parte 1/3)

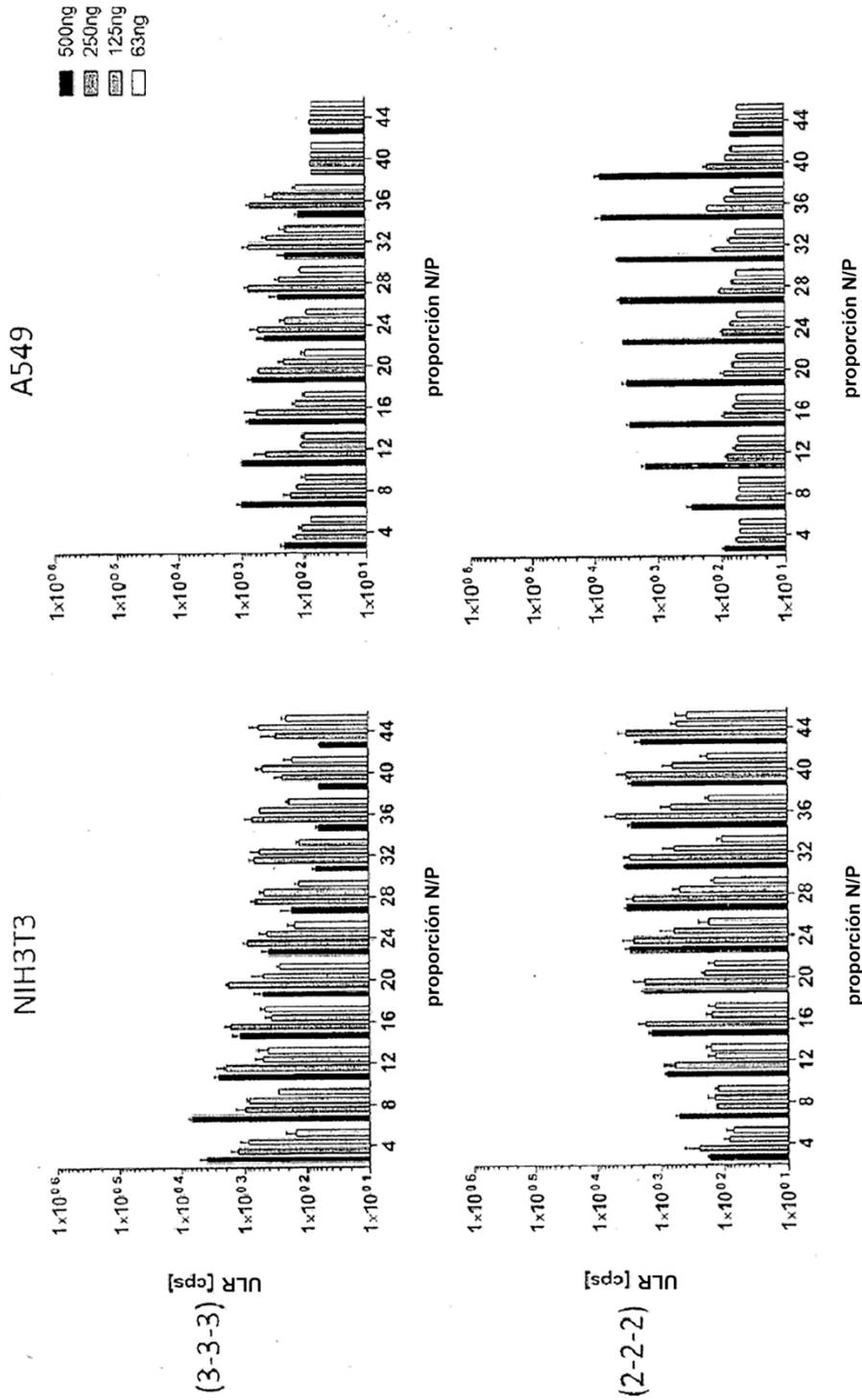


Figura 1 (Parte 2/3)

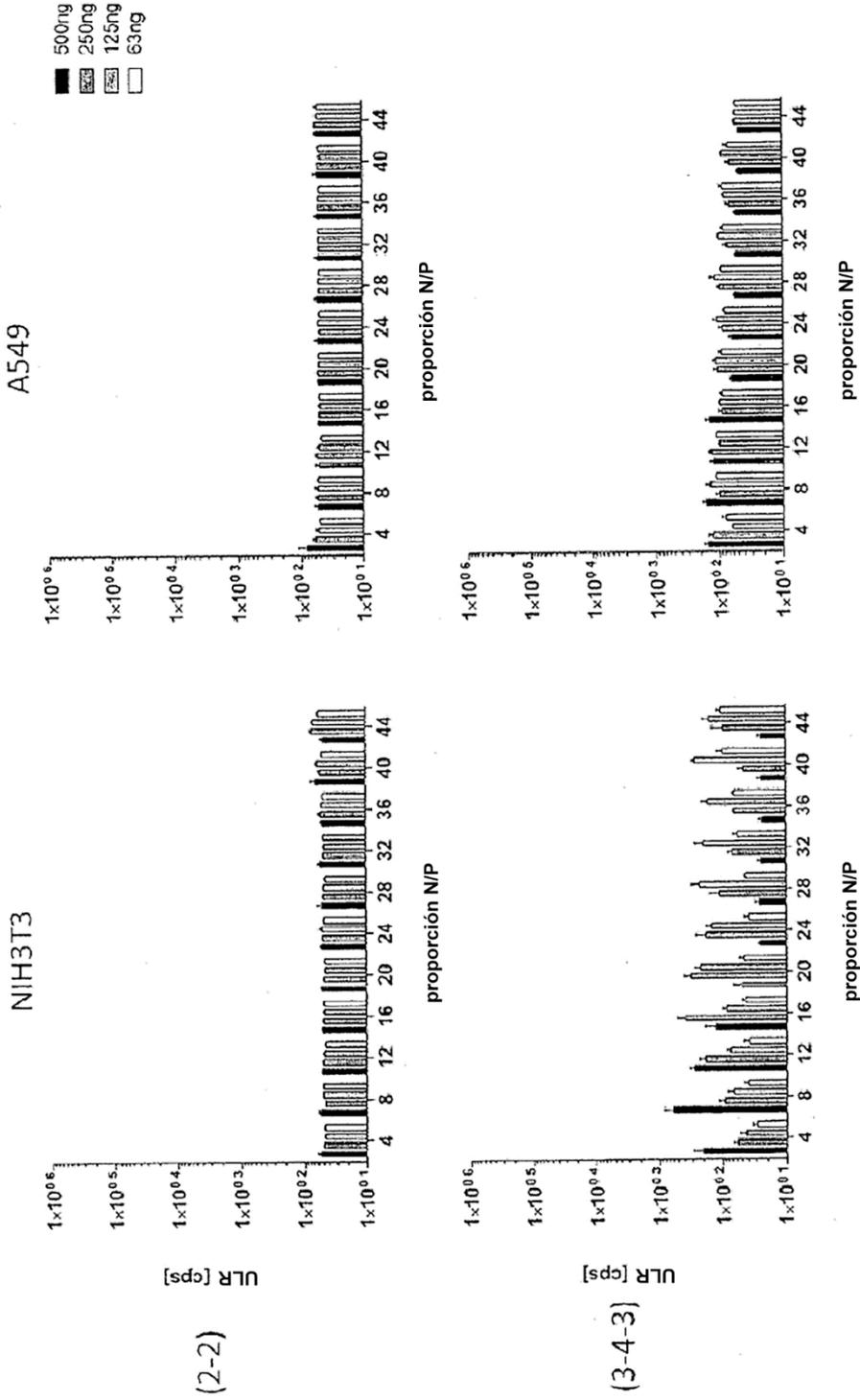


Figura 1 (Parte 3/3)

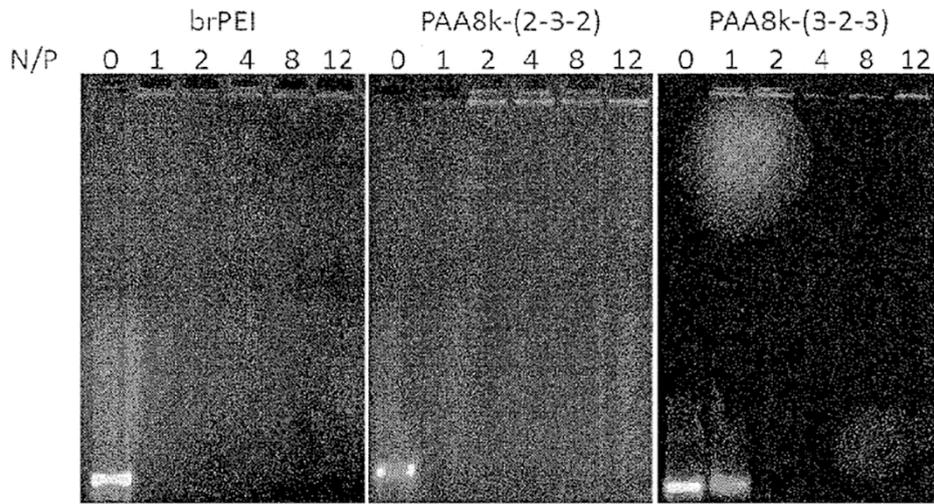


Figura 2

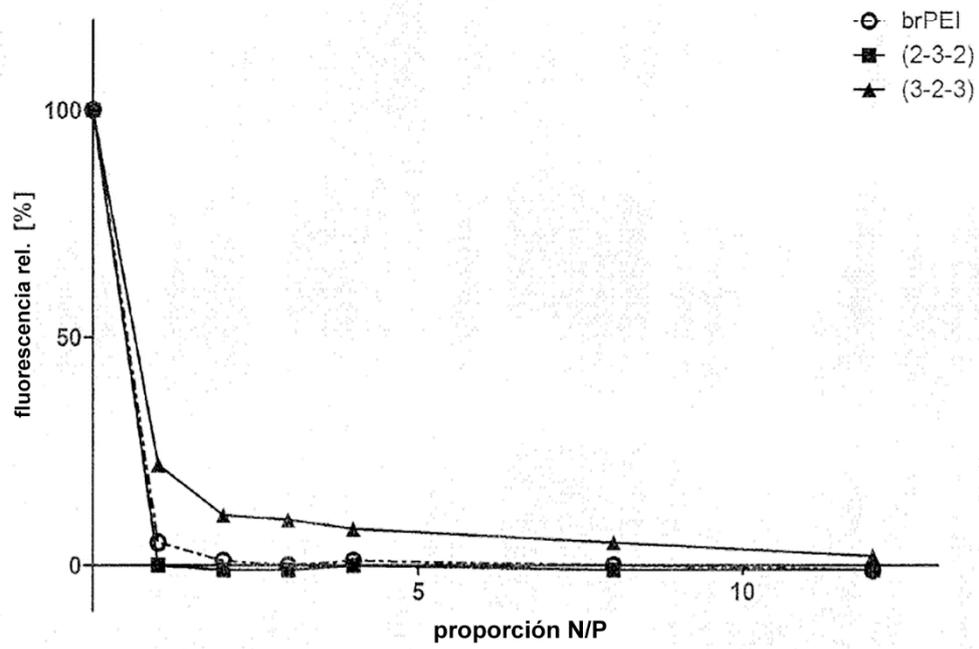


Figura 3

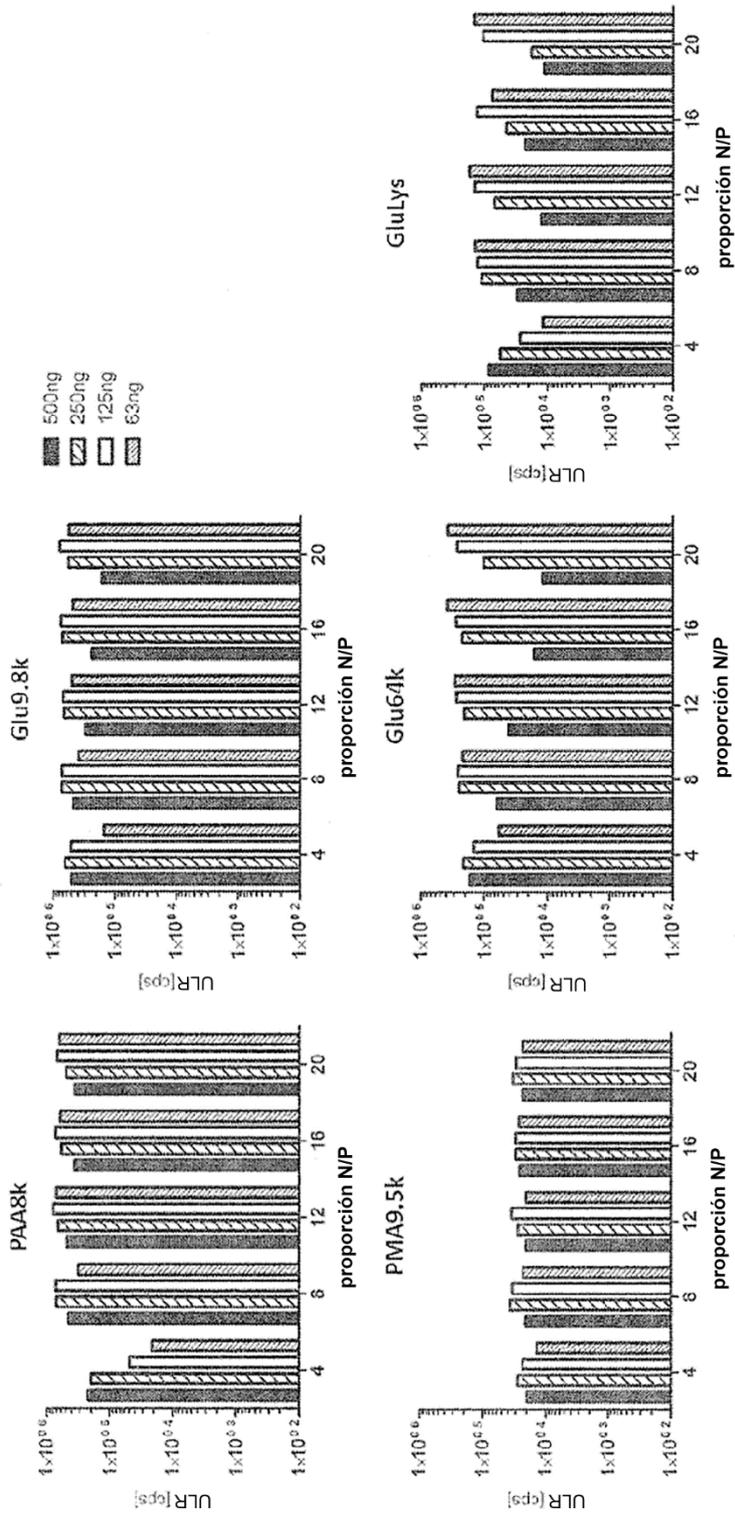


Figura 4

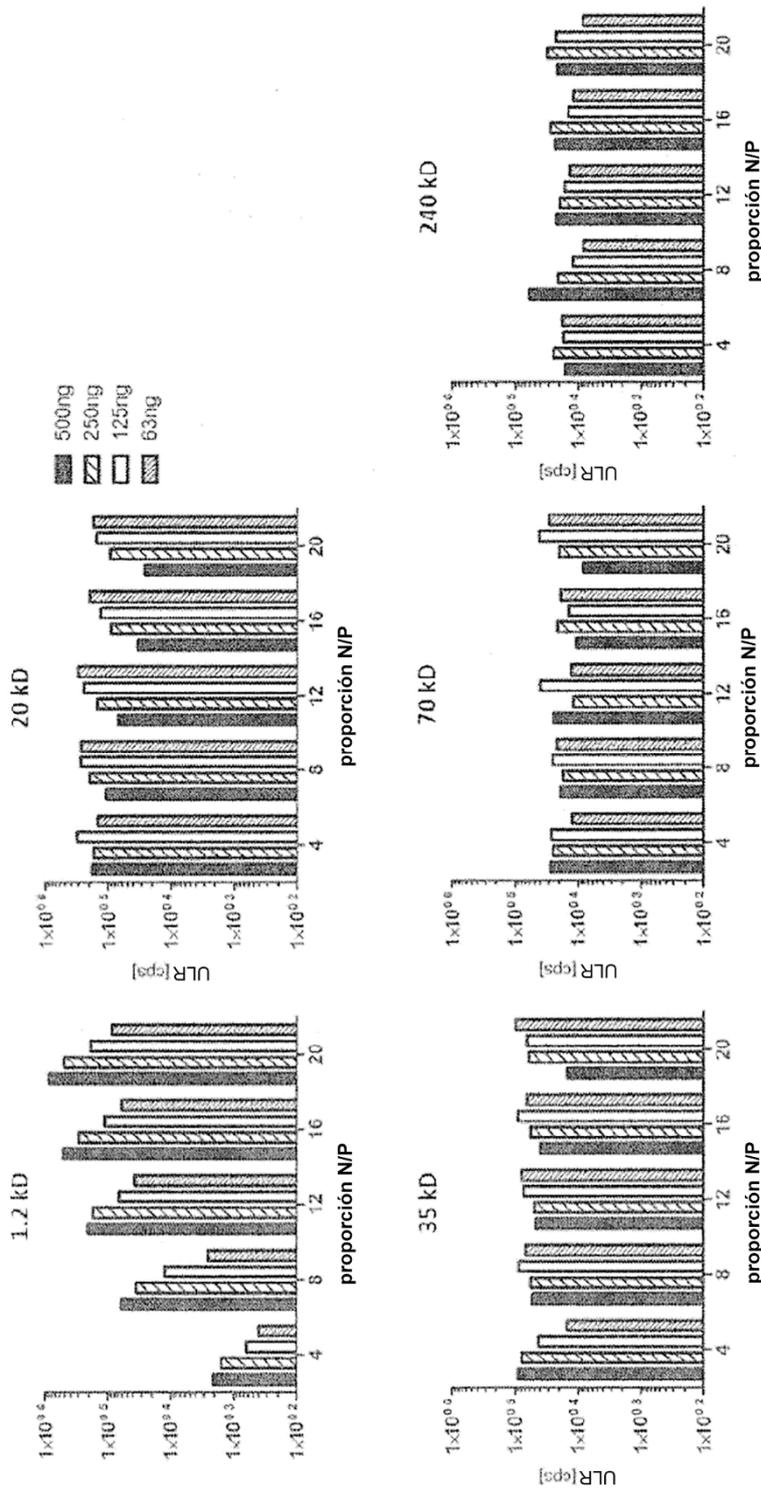


Figura 5

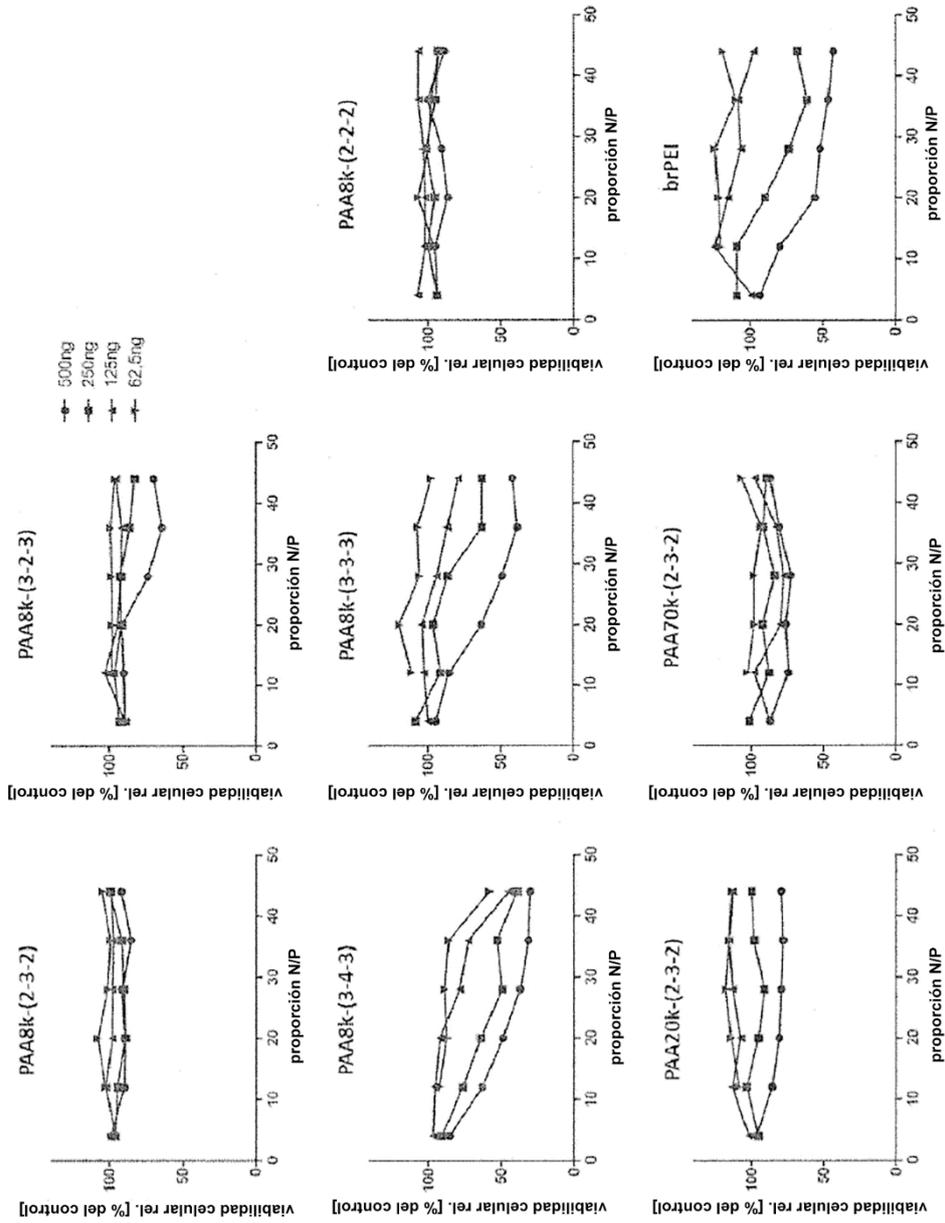


Figura 6

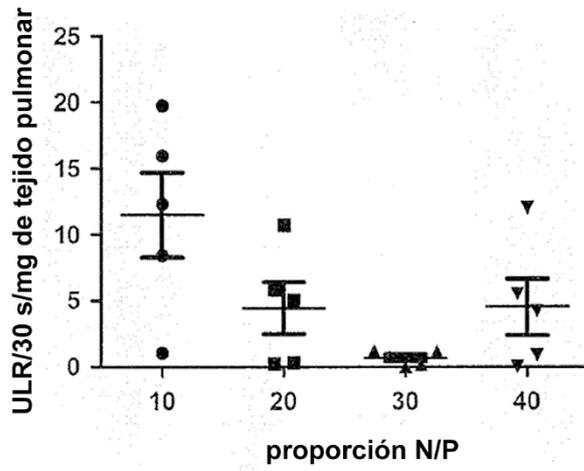


Figura 7

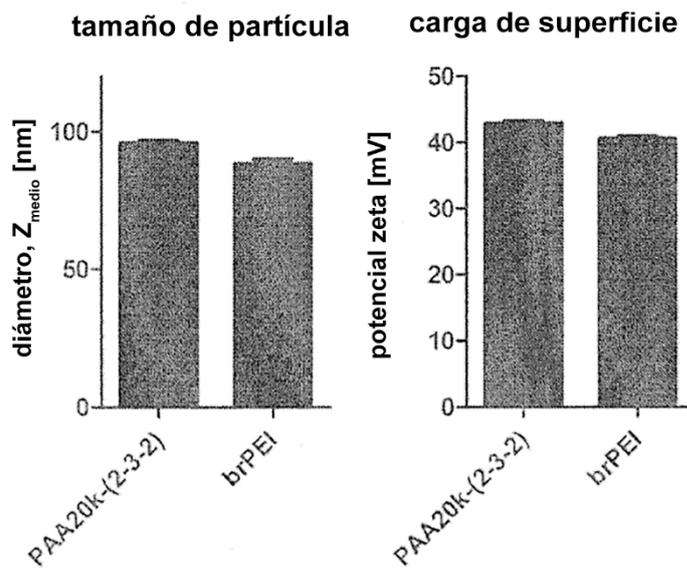


Figura 8

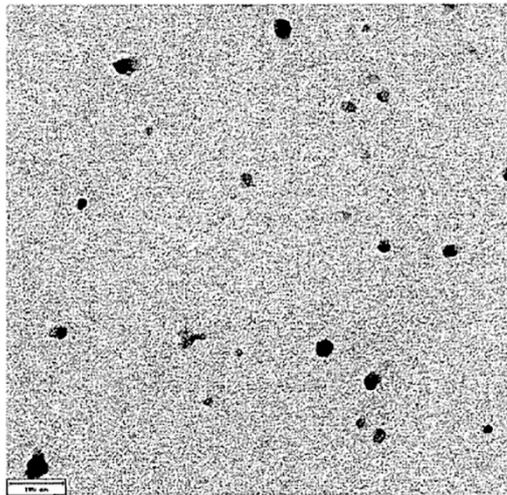


Figura 9

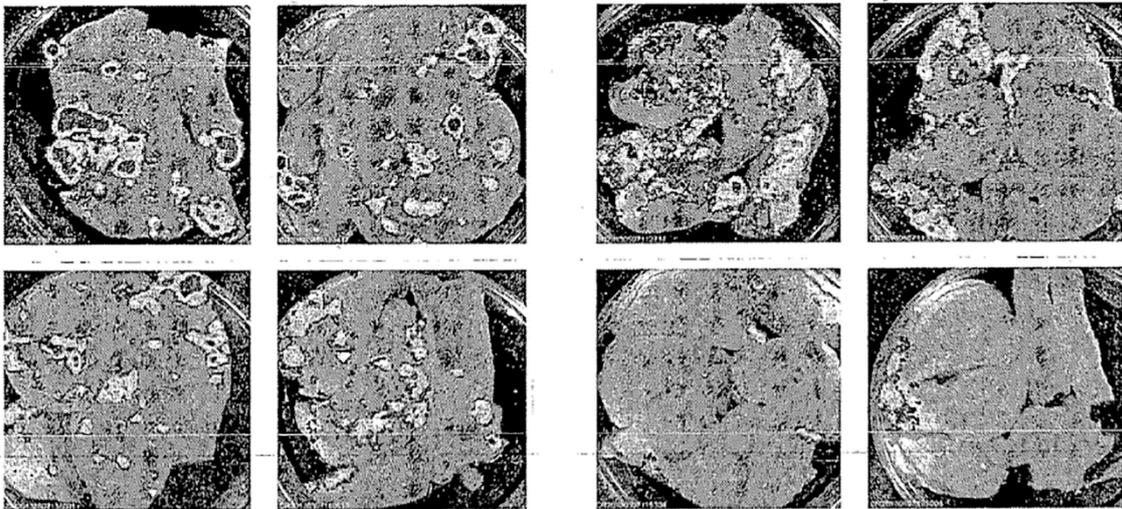


Figura 10

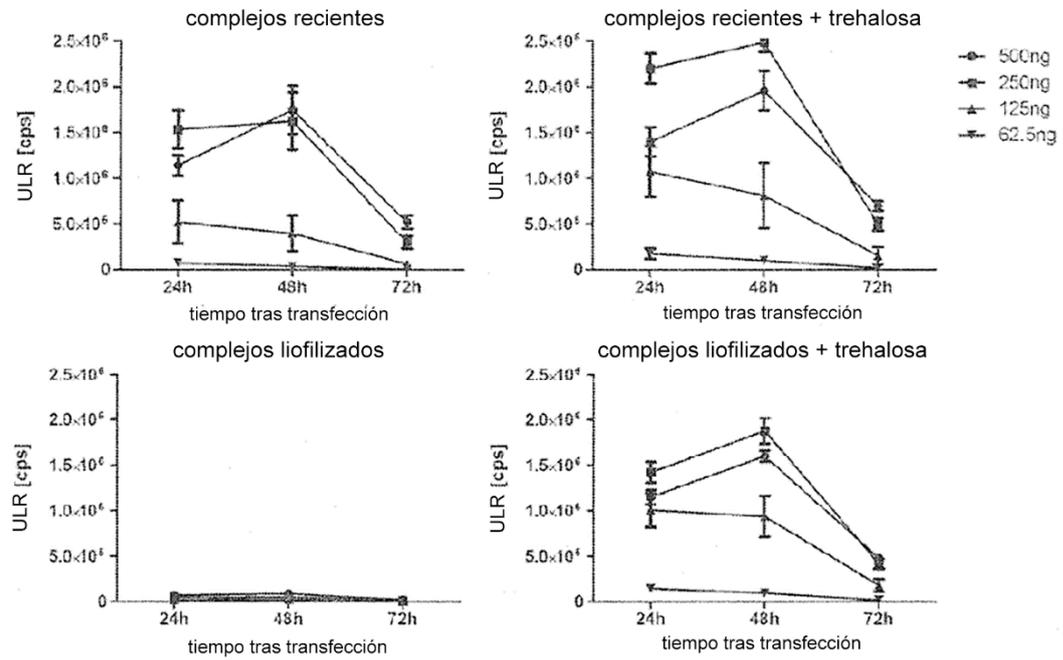


Figura 11

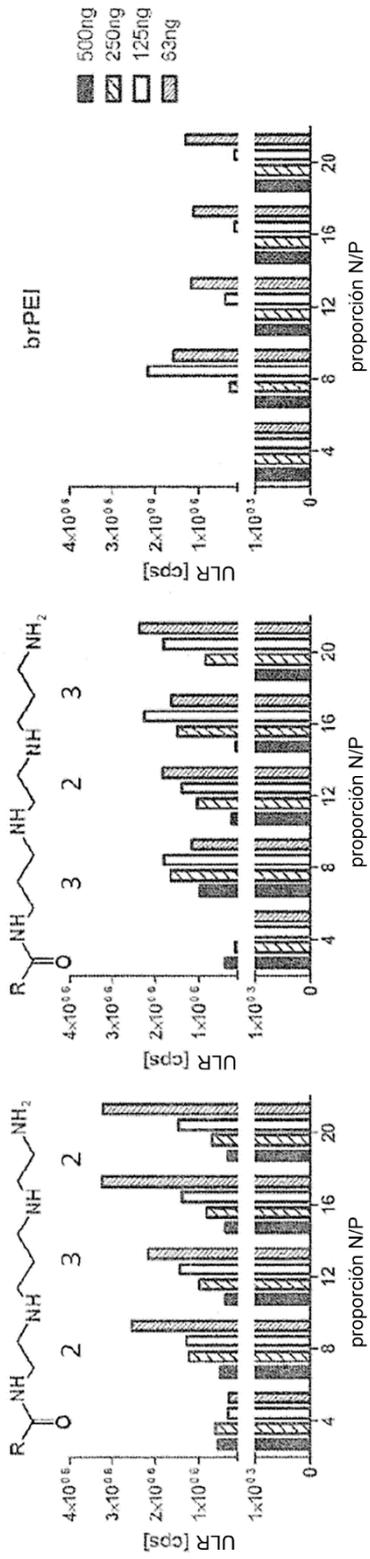


Figura 12

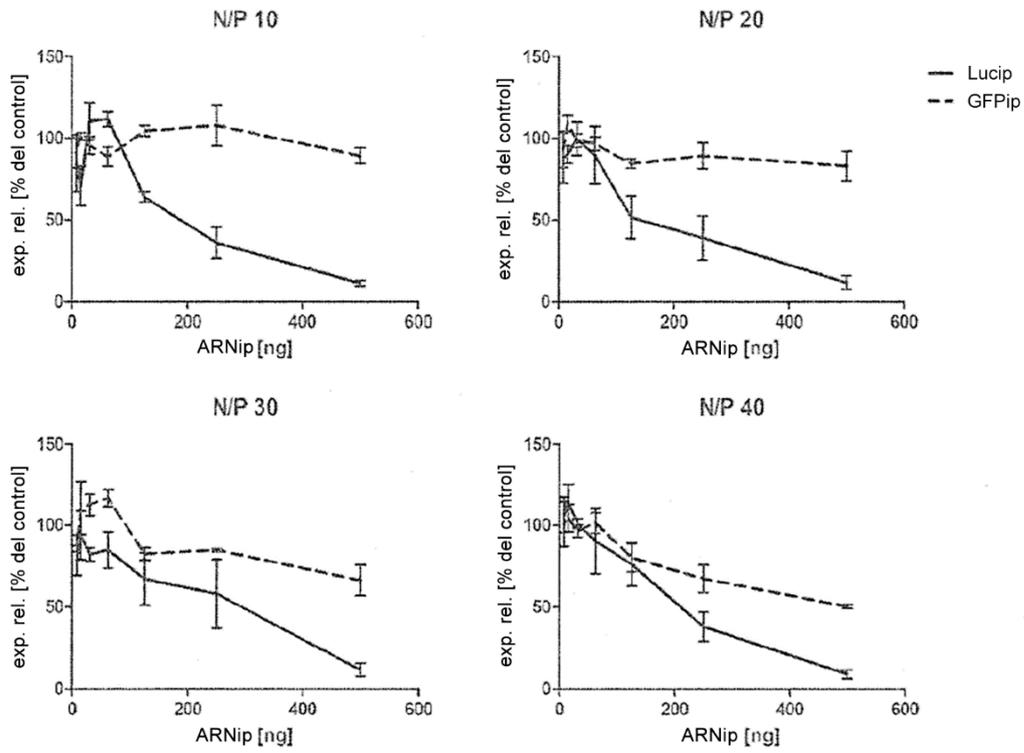


Figura 13

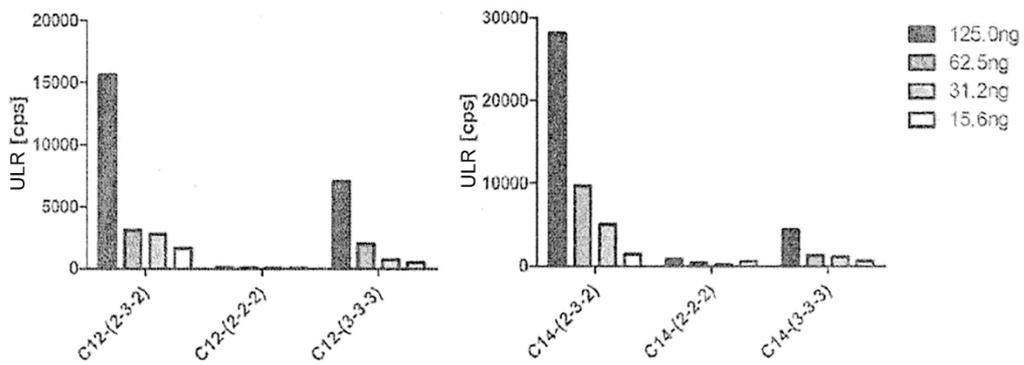


Figura 14

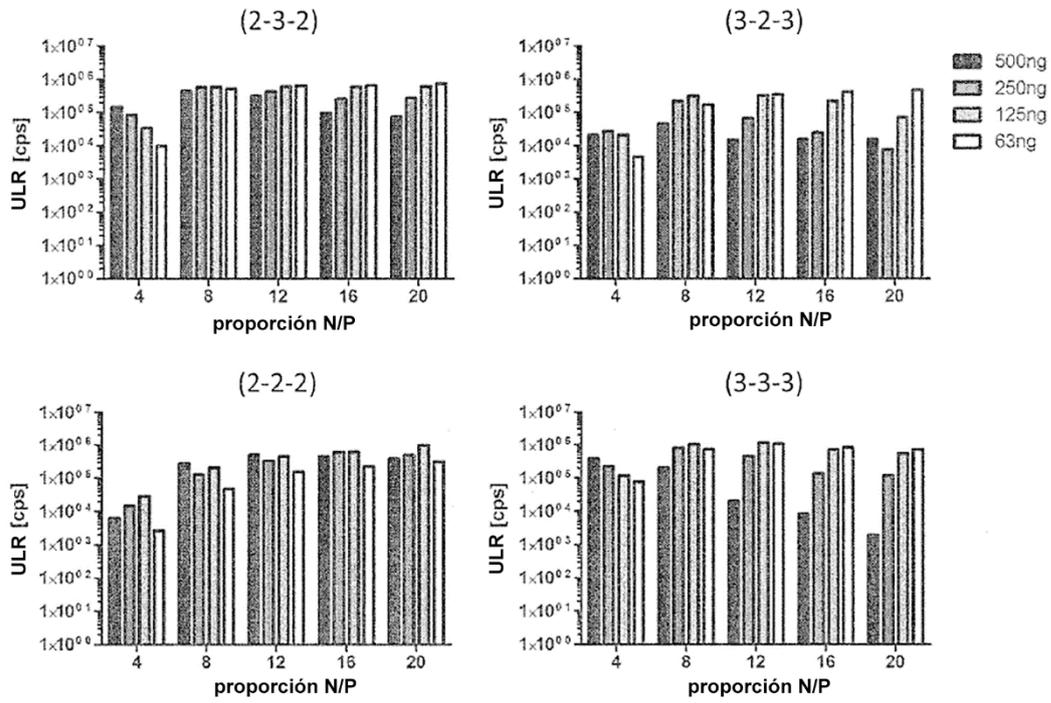


Figura 15

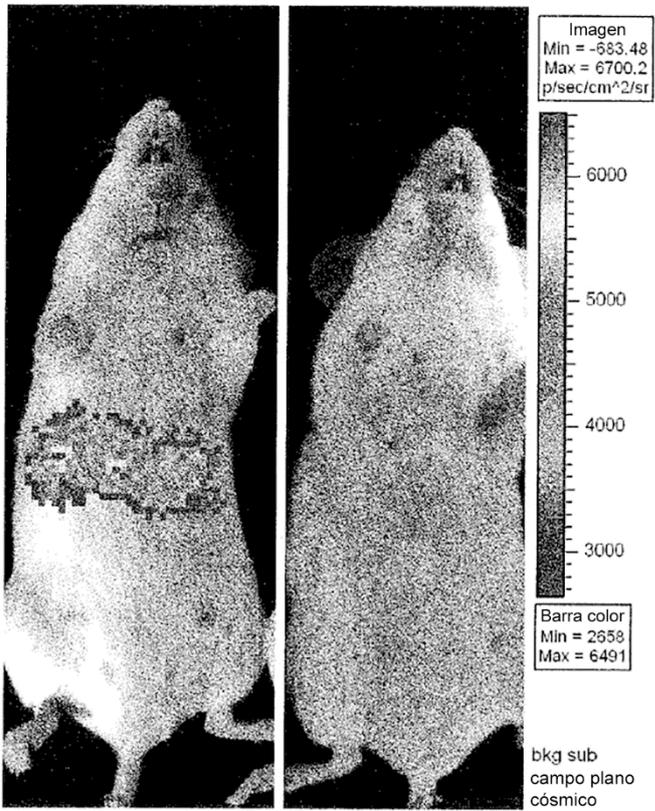
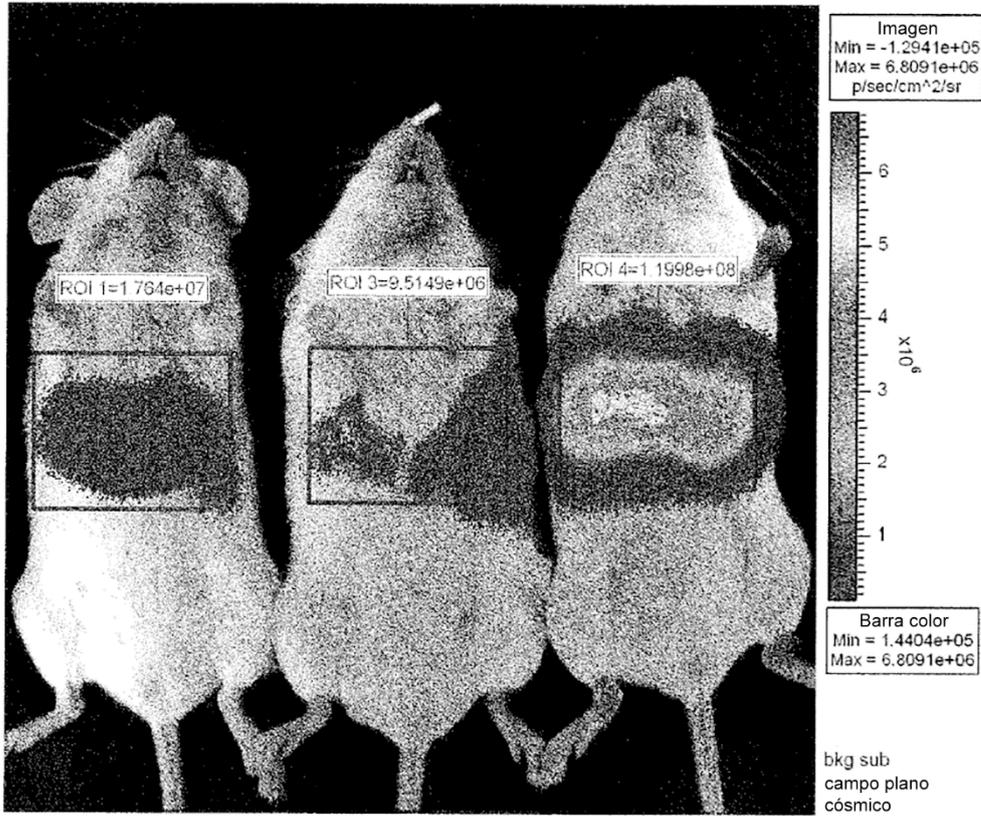


Figura 16

A.



B.

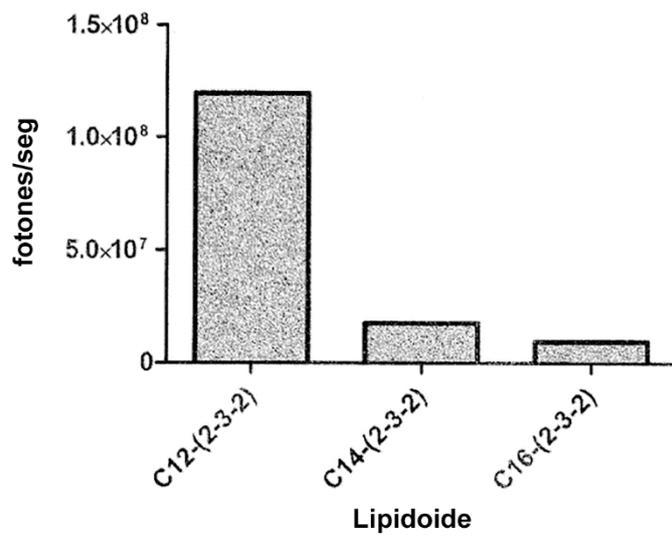
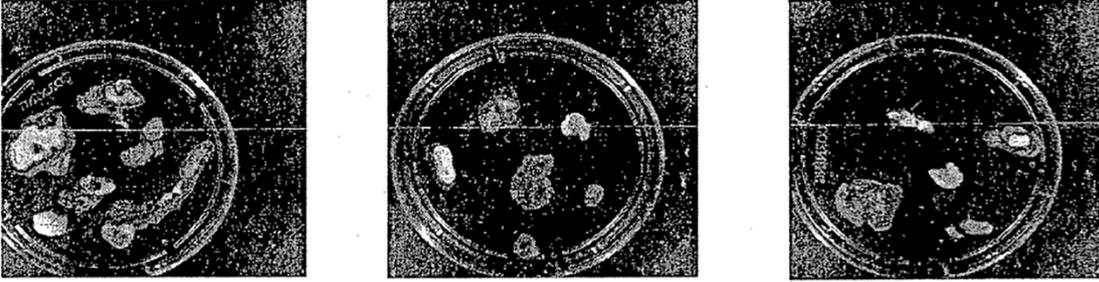


Figura 17

A.



B.

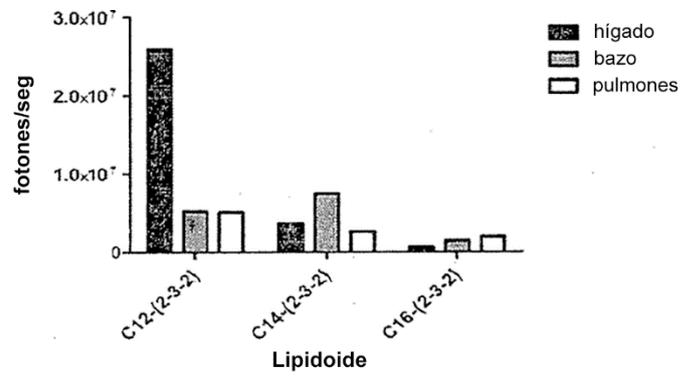


Figura 18

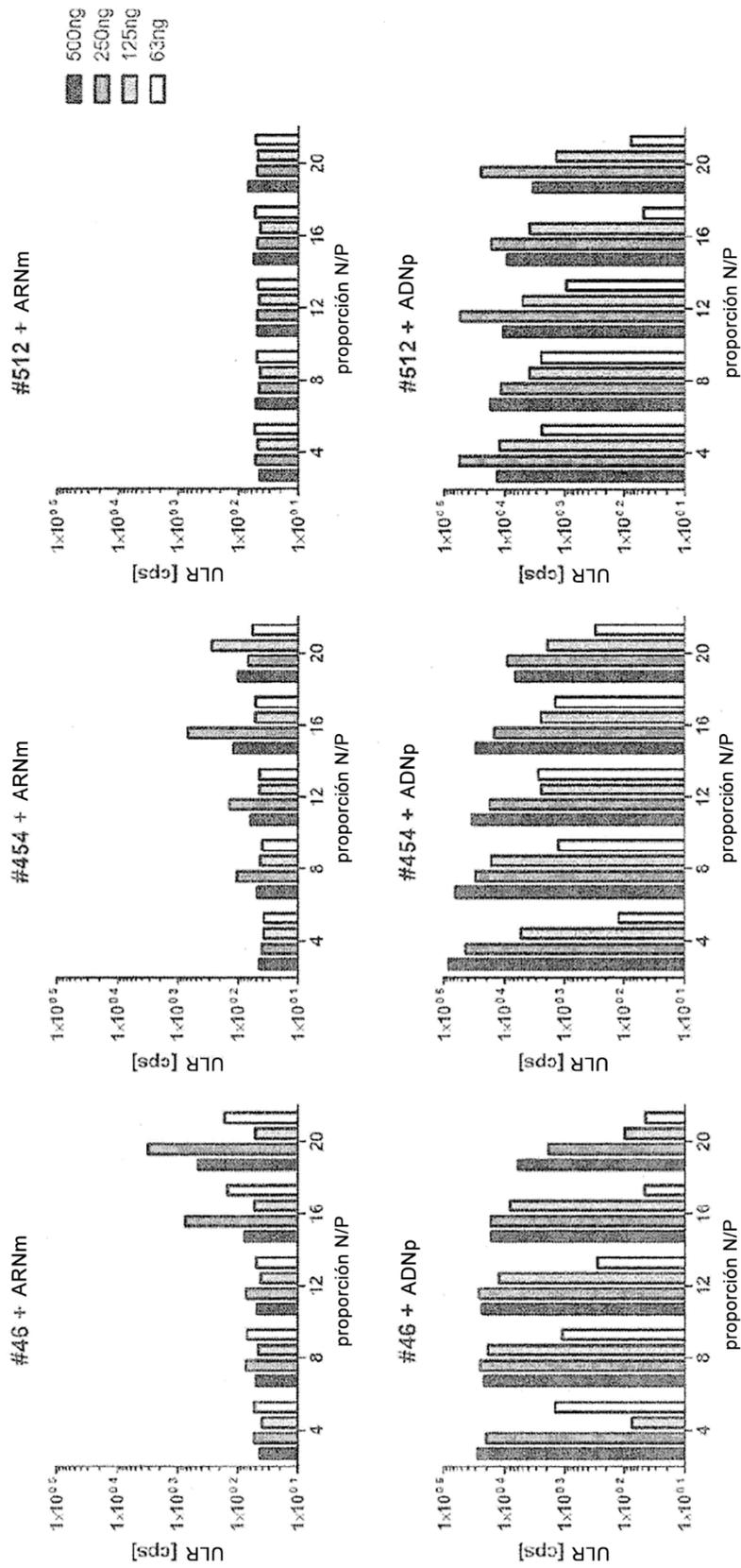


Figura 19

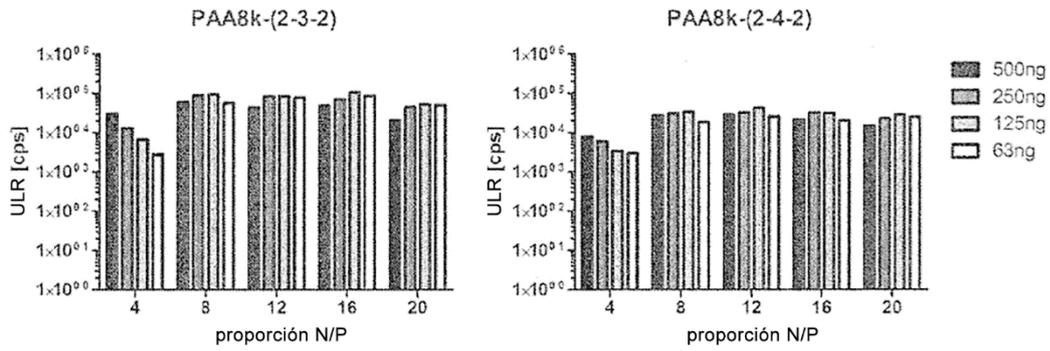


Figura 20

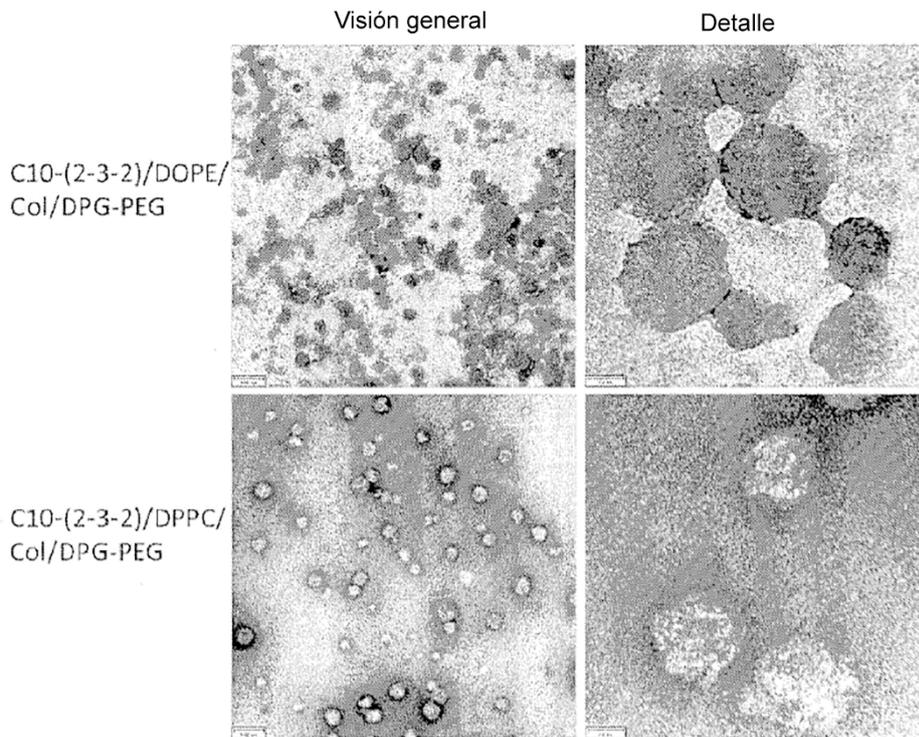


Figura 21

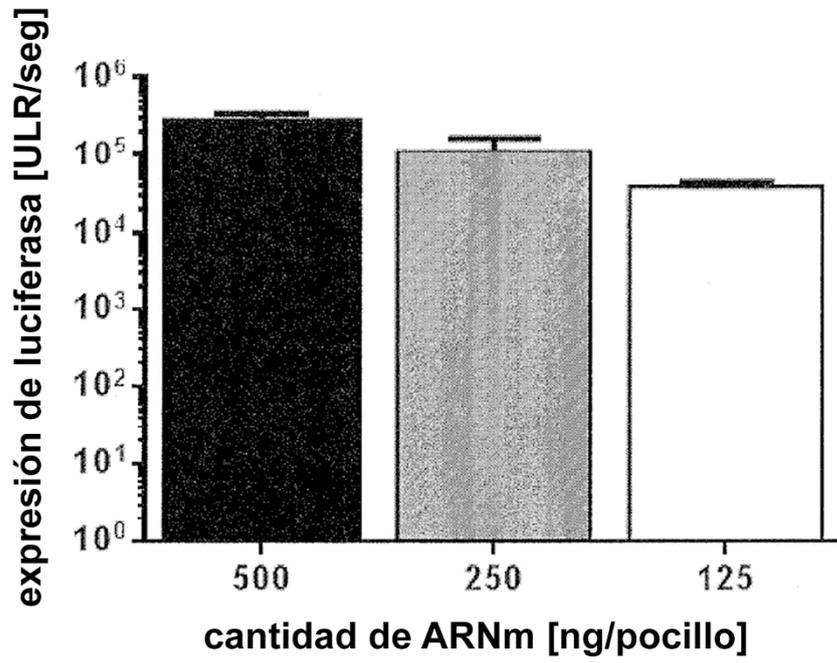


Figura 22

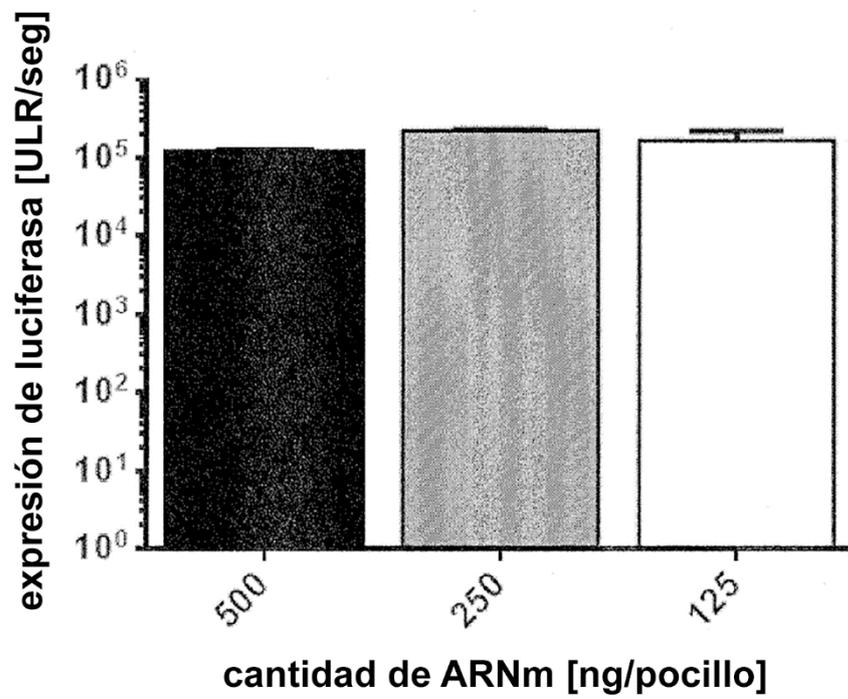


Figura 23

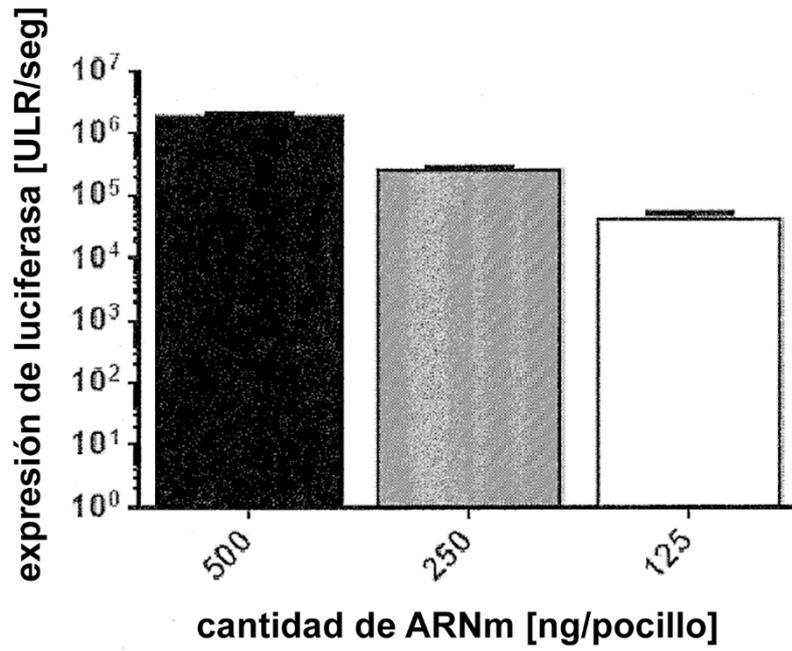


Figura 24

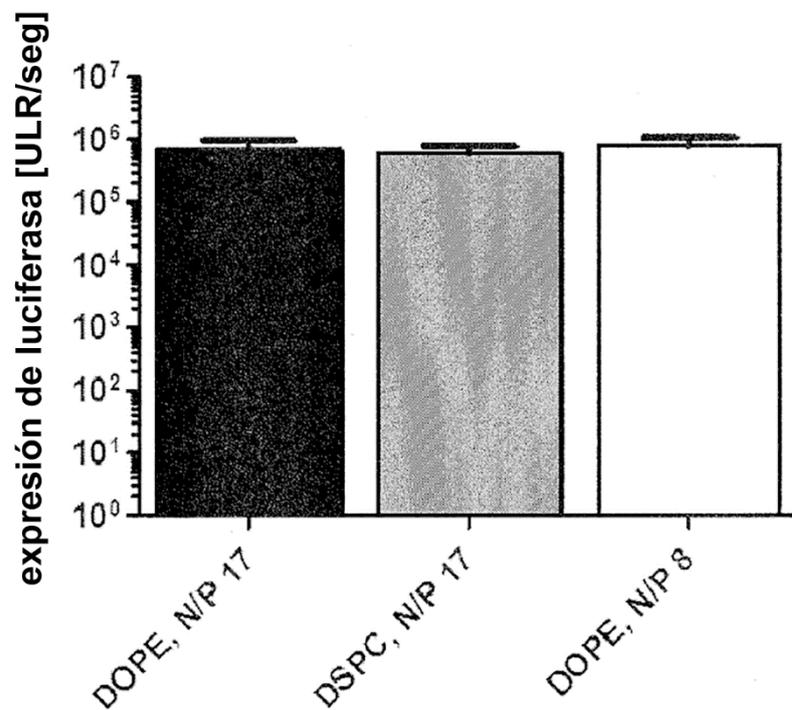


Figura 25

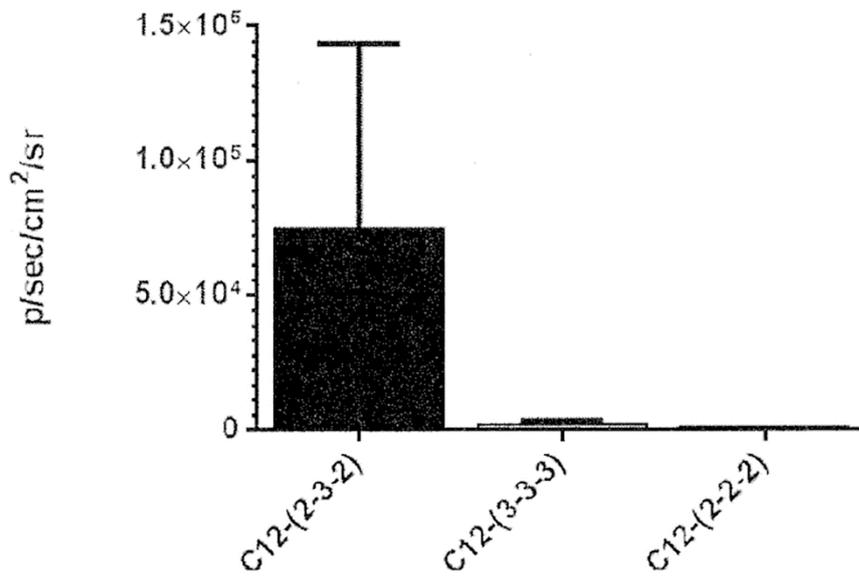
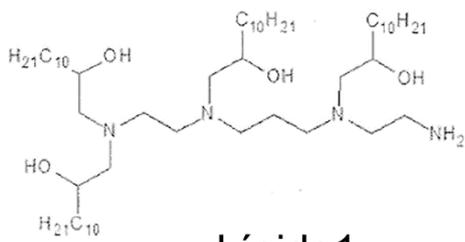
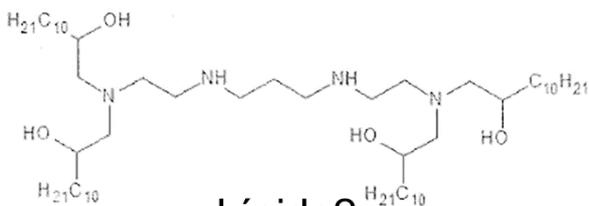


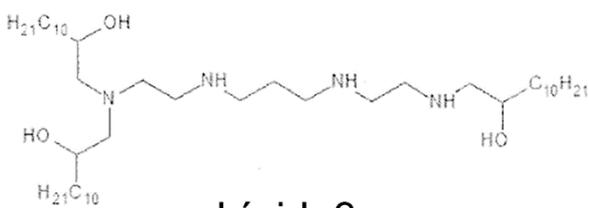
Figura 26



Lípido1



Lípido2



Lípido3

Figura 27 A

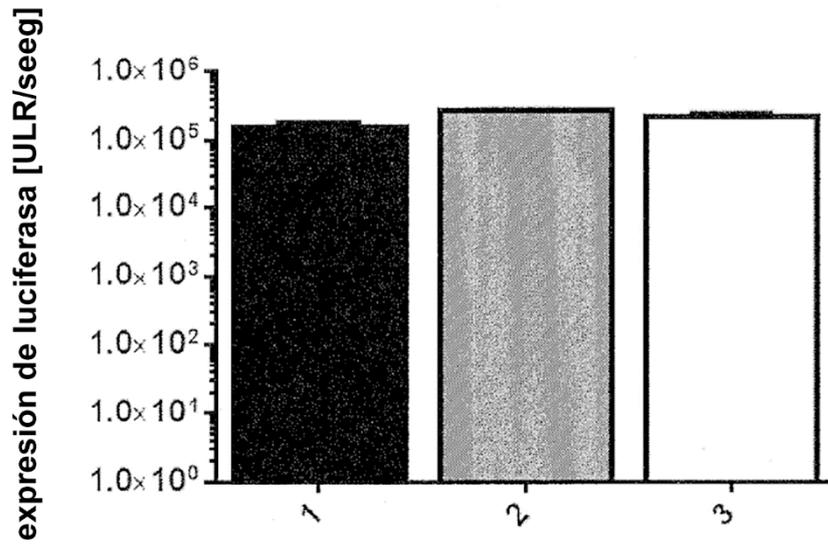


Figura 27 B

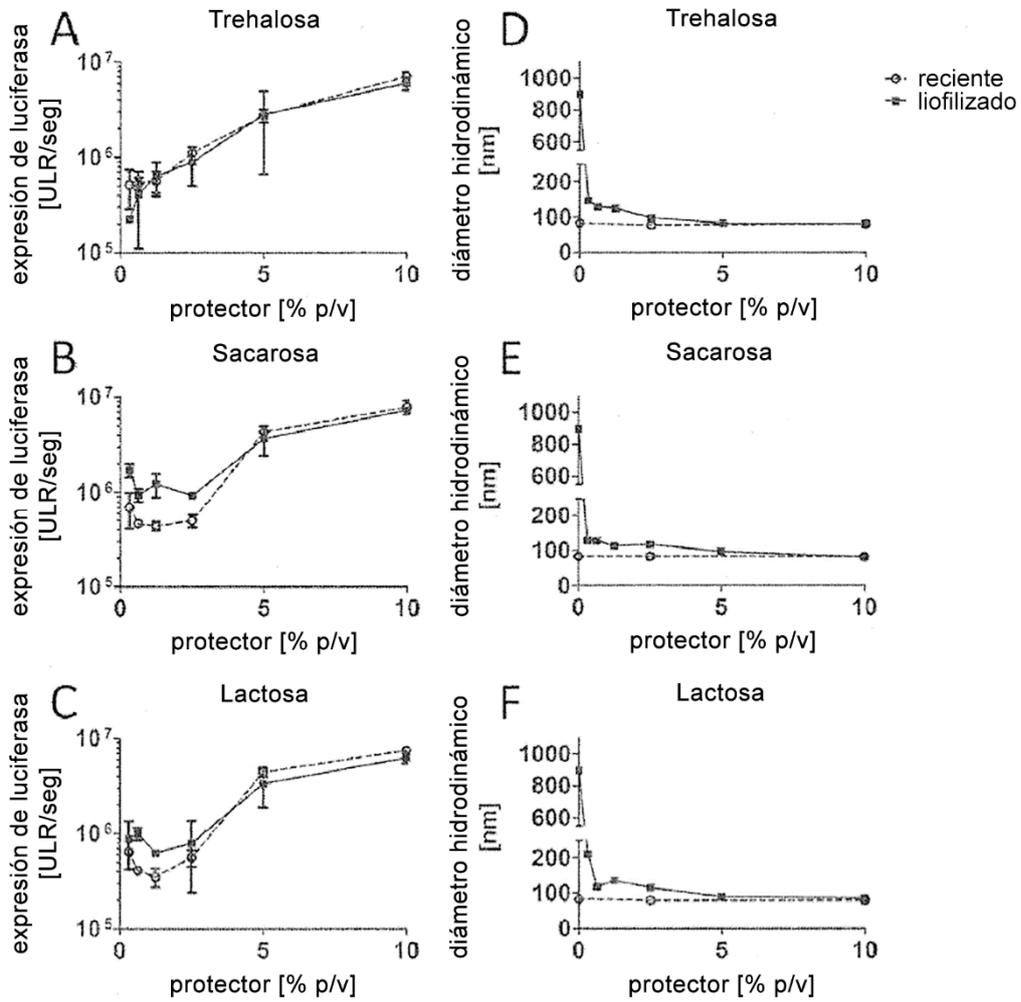
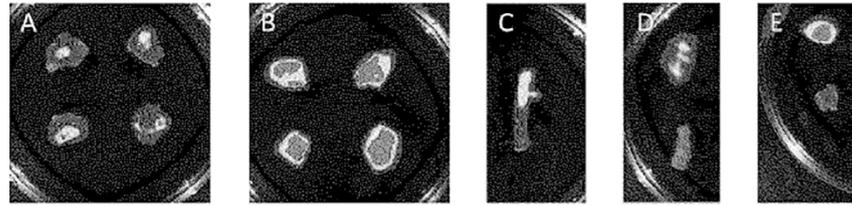


Figura 28



especie	cerdo	cerdo	oveja	oveja	oveja
tejido	músculo	grasa	arteria	músculo	pulmón
cantidad de ARNm [ $\mu\text{g}$ ]	10	10	20	20	20
Tiempo de exposición [s]	60	5	60	60	60

Figura 29

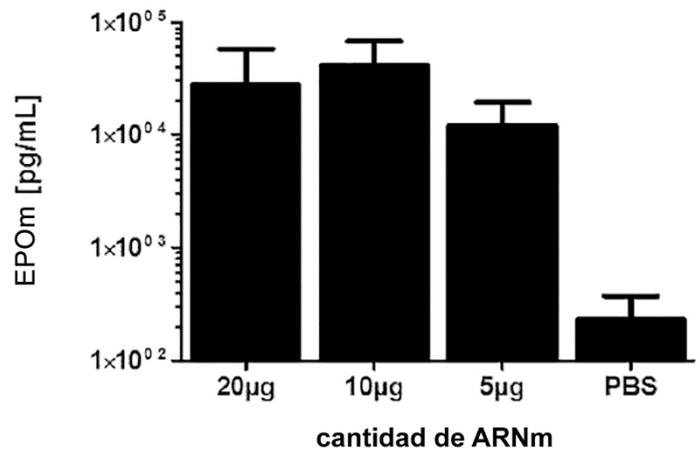
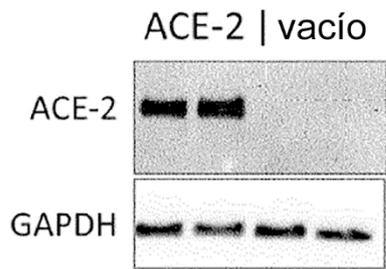


Figura 30

Figura 31

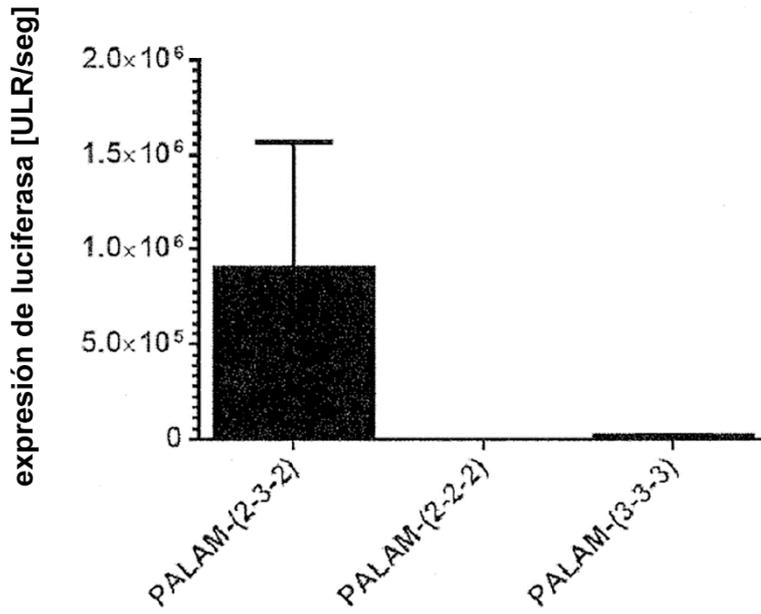


Figura 32

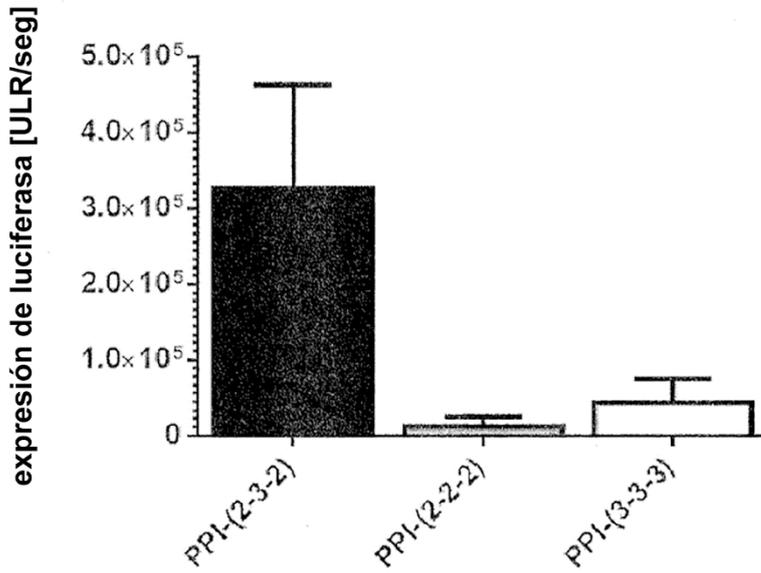


Figura 33

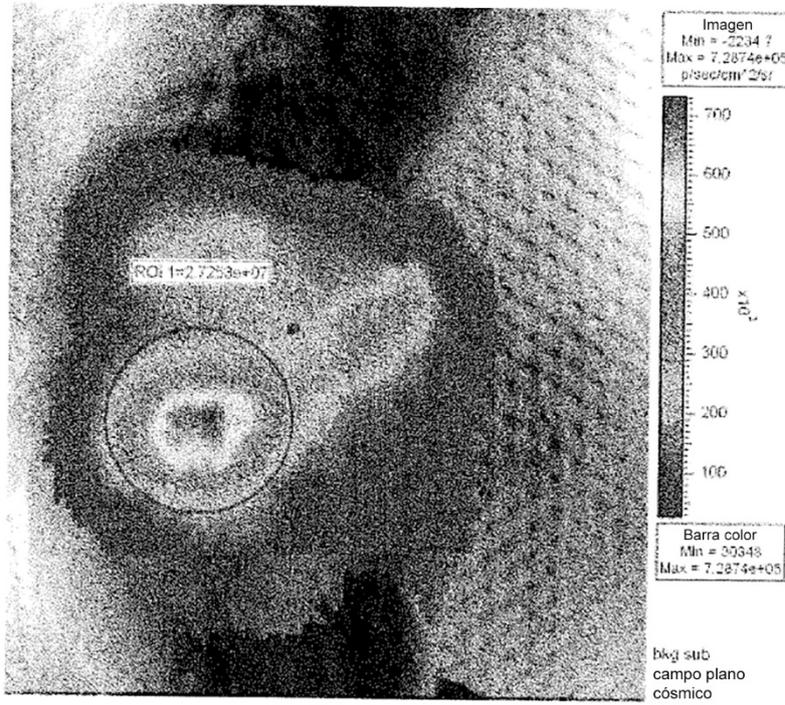


Figura 34