

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 106**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2006 E 06844698 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 1957044**

54 Título: **Formulación de liposomas anfóteros**

30 Prioridad:

01.12.2005 US 741192 P
02.03.2006 US 778473 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.08.2013

73 Titular/es:

PRONAI THERAPEUTICS, INC. (50.0%)
4717 Campus Drive Suite 1100
Kalamazoo MI 49008 , US y
MARINA BIOTECH, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

GOODWIN, NEAL, CLIFFORD;
ENDERT, GEROLD;
HERZOG, NATALIE;
KERWITZ, YVONNE;
PANZNER, STEFFEN y
RODRIGUEZA, WENDI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 419 106 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

Formulación de liposomas anfóteros

5 La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/741.192, presentada el 1 de diciembre de 2005 y la solicitud Provisional de Estados Unidos Nº 60/778.473, presentada el 2 de marzo de 2006, ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a composiciones y procedimientos para usar las mismas para tratar cáncer. En particular, la invención se refiere a oligonucleótidos de ADNi secuestrados con liposomas anfóteros para el tratamiento de cáncer.

Antecedentes

10 Los oncogenes se han convertido en el concepto clave para el entendimiento de la biología del cáncer y pueden proporcionar dianas valiosas para fármacos terapéuticos. En muchos tipos de tumores humanos, incluyendo linfomas y leucemias, los oncogenes están sobreexpresados, y pueden asociarse con tumorigenicidad (Tsujimoto y col., Science 228: 1440-1443 (1985)). Por ejemplo, se han descubierto altos niveles de expresión del gen *bcl-2* humano en todos los linfomas con una traslocación cromosómica t(14; 18) incluyendo la mayoría de los linfomas de linfocitos B foliculares y muchos linfomas no de Hodgkin de células grandes. También se han descubierto altos niveles de expresión del gen *bcl-2* en ciertas leucemias que no tienen una traslocación cromosómica t(14; 18), incluyendo la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica aguda, muchas leucemias linfocíticas del tipo prelinfocitos B, neuroblastomas, carcinomas nasofaríngeos y muchos adenocarcinomas de la próstata, mama y colon (Reed y col., Cancer Res. 51: 6529 [1991]; Yunis y col., New England J. Med. 320: 1047; Campos y col., Blood 81: 3091-3096 [1993]; McDonnell y col., Cancer Res. 52: 6940-6944 [1992]; Lu y col., Int. J Cancer 53: 29-35 [1993]; Bonner y col., Lab Invest. 68: 43A [1993]). Otros oncogenes incluyen TGF- α , c-ki-ras, ras, Her-2 y c-myc.

La expresión de oncogenes puede inhibirse por oligonucleótidos de ADNi monocatenarios. Los productos terapéuticos de ácido nucleico, sin embargo, carecen con frecuencia de eficacia terapéutica debido a la inestabilidad en los fluidos corporales o captación ineficaz en células.

25 Existe por lo tanto una necesidad de un suministro estable y eficaz de dichos oligonucleótidos de ADNi en fluidos corporales y células para tratamiento del cáncer. El documento WO 02/092617 A1 enseña un tratamiento combinado de cáncer por una combinación de un oligómero antisentido con c-myc y un agente quimioterapéutico convencional. El oligómero antisentido puede dirigirse a un iniciador o sitio promotor de c-myc. El documento WO 98/14172 A2 sugiere oligonucleótidos antisentido y polinucleótidos dirigidos a parte de los genes *bcl-2* y su uso en el tratamiento del cáncer. Las construcciones antisentido pueden diseñarse para unirse al promotor y otras regiones de control del gen. El documento WO 95/08350 A1 describe oligómeros antisentido y procedimientos para usarlos para controlar el crecimiento de células cancerosas que expresan el gen *bcl-2*. El documento WO 2004/056971 A2 sugiere el uso de oligómeros antisentido de *bcl-2* para tratar y prevenir trastornos relacionados con *bcl-2* tales como cánceres, tumores, carcinomas y trastornos relacionados con proliferación de células. El documento se refiere además a composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más oligómeros antisentido de *bcl-2*, que pueden comprender uno o más agentes terapéuticos de cáncer.

Sumario de la invención

40 La invención proporcionar una mezcla que comprende un oligonucleótido de ADNi de SEC ID Nº: 1251 y un liposoma anfótero, en el que el liposoma comprende una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras, en el que la mezcla de componentes lipídicos comprende componentes aniónicos y catiónicos, en el que al menos uno de dichos componentes es sensible a pH y lípidos neutros, en los que los lípidos neutros comprenden fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas o esteroides y la mezcla contiene del 5 al 95 % molar de lípidos cargados y del 5 al 95 % de lípidos neutros.

45 La invención proporciona además una mezcla que comprende un liposoma anfótero y un oligonucleótido de ADNi que comprende SEC ID Nº: 1251 o 1250 o el complemento del mismo en la que el liposoma comprende POPC, DOPE, MoChol y CHEMS en la relación molar de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS de 6/24/47/23 o 15/45/20/20.

Además, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de las mezclas anteriores.

50 Además, la invención proporciona un procedimiento *in vitro* para introducir un oligonucleótido de ADNi en una célula que comprende poner en contacto la célula con cualquiera de las mezclas anteriores, en el que la introducción de las composiciones da como resultado una reducción de proliferación de la célula o induce muerte celular.

Dichos liposomas anfóteros pueden, por ejemplo, tener una carga aniónica o neutra a pH fisiológico y una carga catiónica a un pH ácido de aproximadamente 4. Ventajosamente, las composiciones de la presente invención secuestran grandes cantidades de oligonucleótidos de ADNi, entre aproximadamente 1 y 4 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 2 mg/ml) a una concentración de lípidos de aproximadamente 10 a 100 mM o menos; muestran estabilidad coloidal y en suero; captación potenciada en células y tumores debido a tamaños de liposoma medios de menos de 200 nm; y baja toxicidad en relación con liposomas formados con lípidos catiónicos que se usan en reactivos de transfección convencionales.

En un primer aspecto, la invención proporciona una mezcla que comprende liposomas anfóteros y un oligonucleótido de ADNi. En una realización del primer aspecto, los liposomas anfóteros tienen un punto isoeléctrico de entre 4 y 8. En una realización adicional, los liposomas anfóteros están cargados negativamente o son neutros a pH 7,4 y están cargados positivamente a pH 4.

En otra realización del primer aspecto, los liposomas anfóteros incluyen lípidos anfóteros. En una realización adicional, los lípidos anfóteros pueden ser HistChol, HistDG, isoHistSucc DG, Acilcarnosina, HCChol o combinaciones de los mismos. En otra realización, los liposomas anfóteros incluyen una mezcla de uno o más lípidos catiónicos y uno o más lípidos aniónicos. En otra realización más, los lípidos catiónicos pueden ser DMTAP, DPTAP, DOTAP, DC-Chol, MoChol o HisChol, o combinaciones de los mismos, y los lípidos aniónicos pueden ser CHEMS, DGSucc, Cet-P, DMGSucc, DOGSucc, POGSucc, DPGSucc, DG Succ, DMPS, DPPS, DOPS, POPS, DMPG, DPPG, DOPG, POPG, DMPA, DPPA, DOPA, POPA o combinaciones de los mismos.

En otra realización más, los liposomas también incluyen lípidos neutros. En una realización adicional, los lípidos neutros incluyen esteroides y derivados de los mismos. En una realización adicional más, los esteroides comprenden colesteroides y derivados de los mismos. Los lípidos neutros también pueden incluir fosfolípidos neutros. En una realización, los fosfolípidos incluyen fosfatidilcolinas o fosfatidilcolinas y fosfoetanolaminas. En otra realización, las fosfatidilcolinas son POPC, OPPC, PC de soja hidrogenada o natural, PC de huevo hidrogenada o natural, DMPC, DPPC o DOPC y derivados de los mismos y las fosfatidiletanolaminas son DOPE, DMPE, DPPE o derivados y combinaciones de los mismos. En una realización adicional, la fosfatidilcolina es POPC, OPPC, PC de soja o PC de huevo y las fosfatidiletanolaminas son DOPE.

En una realización adicional más, los lípidos de los liposomas anfóteros incluyen DOPE, POPC, CHEMS y MoChol; POPC, Chol, CHEMS y DOTAP; POPC, Chol, Cet-P y MoChol, o POPC, DOPE, MoChol y DMGSucc.

En un segundo aspecto, los liposomas anfóteros de la mezcla de la invención pueden formarse a partir de una fase lipídica que comprende una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras, en la que la cantidad total de lípidos cargados en el liposoma puede variar del 5 % molar al 70 % molar, la cantidad total de lípidos neutros puede variar del 20 % molar al 70 % molar, y un oligonucleótido de ADNi. En una realización del primer aspecto, los liposomas anfóteros incluyen del 3 al 20 % molar de POPC, del 10 al 60 % molar de DOPE, del 10 al 60 % molar de MoChol y del 10 al 50 % molar de CHEMS. En una realización adicional, los liposomas incluyen POPC, DOPE, MoChol y CHEMS en las relaciones molares de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS de aproximadamente 6/24/47/23 o 15/45/20/20. En otra realización más, los liposomas incluyen del 3 al 20 % molar de POPC, del 10 al 40 % molar de DOPE, del 15 al 60 % molar de MoChol y del 15 al 60 % molar de DMGSucc. En una realización adicional, los liposomas incluyen POPC, DOPE, DMGSucc y MoChol en las relaciones molares de POPC/DOPE/DMGSucc/MoChol de aproximadamente 6/24/47/23 o 6/24/23/47. En otra realización más, los liposomas incluyen del 10 al 50 % molar de POPC, del 20 al 60 % molar de Chol, del 10 al 40 % molar de CHEMS y del 5 al 20 % molar de DOTAP. En una realización adicional, los liposomas incluyen POPC, Chol, CHEMS y DOTAP en la relación molar de POPC/Chol/CHEMS/DOTAP de aproximadamente 30/40/20/10. En otra realización más los liposomas incluyen del 10 al 40 % molar de POPC, del 20 al 50 % molar de Chol, del 5 al 30 % molar de Cet-P y del 10 al 40 % molar de MoChol. En una realización adicional, la relación molar de POPC/Chol/Cet-P/MoChol es de aproximadamente 35/35/10/20.

En un cuarto aspecto, la mezcla de oligonucleótido de ADNi-liposoma anfótero incluye los oligonucleótidos de ADNi SEC ID N°: 1250 o 1251 y liposomas anfóteros que comprenden POPC, DOPE, MoChol y CHEMS en la relación molar de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS de aproximadamente 6/24/47/23.

En un quinto aspecto, la mezcla de oligonucleótido de ADNi-liposoma anfótero incluye el oligonucleótido de ADNi PNT-100 (SEC ID N°: 1251), y liposomas anfóteros que comprenden POPC, DOPE, MoChol y CHEMS en la relación molar de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS de aproximadamente 15/45/20/20.

En un sexto aspecto, los liposomas anfóteros de la mezcla pueden incluir un tamaño entre 50 y 500 nm. En una realización, el tamaño es entre 80 y 300 nm y en otra realización el tamaño es entre 90 y 200 nm.

En un séptimo aspecto, los liposomas anfóteros pueden tener un punto isoeléctrico entre 4 y 8. En una realización del sexto aspecto, los liposomas anfóteros pueden estar cargados negativamente o ser neutros a pH 7,4 y estar cargados positivamente a pH 4.

En un octavo aspecto, los liposomas anfóteros tienen una concentración de oligonucleótidos de ADNi de al menos aproximadamente 2 mg/ml a una concentración de lípidos de 10 a 100 mM o menos.

5 En un noveno aspecto, la invención proporciona un procedimiento para preparar liposomas anfóteros que contienen un oligonucleótido de ADNi. En una realización, el procedimiento incluye usar un procedimiento de carga activa y, en otro, un procedimiento de carga pasiva. En una realización adicional, el procedimiento produce liposomas usando extrusión manual, extrusión mecánica, homogeneización, microfluidificación o inyección de etanol. En otra realización más, el procedimiento tiene una eficacia de encapsulación de al menos el 35 %.

10 En un décimo aspecto, la invención proporciona un procedimiento para introducir la mezcla de liposoma anfótero-oligonucleótido de ADNi a células o un animal. En una realización, el procedimiento incluye administrar la mezcla a un mamífero para tratar cáncer. Las mezclas administradas pueden reducir o detener el crecimiento tumoral en mamíferos. En otra realización, la introducción de la mezcla da como resultado una reducción de la proliferación celular. En otra realización, la mezcla se administra a una célula cancerosa, un animal no humano o un ser humano. En una realización adicional, la mezcla se introduce a un animal a una dosificación de entre 0,01 mg y 100 mg por kg de peso corporal. En otra realización más, la mezcla se introduce al animal una o más veces al día o de forma continua. En otra realización más, la mezcla se introduce al animal mediante administración tópica, pulmonar o parenteral o mediante un dispositivo médico. En una realización adicional más, la mezcla administrada al animal o células incluye además un agente de quimioterapia y/o un componente de dirección celular.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros en el tamaño de tumores de xenoinjertos WSU-DLCL2 de Linfoma no de Hodgkin en ratones SCID.

20 La Figura 2 muestra el efecto de diferentes lotes de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros en el tamaño de tumores de xenoinjertos WSU-DLCL2 de Linfoma no de Hodgkin en ratones SCID

La Figura 3 muestra la carga tumoral en ratones que portan xenoinjertos WSU-DLCL2 de Linfoma no de Hodgkin tratados con SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros.

La Figura 4 muestra una evaluación de respuesta a dosis de dos formulaciones de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros en ratones que portan xenoinjertos WSU-DLCL2.

25 La Figura 5 muestra una vista ampliada de una evaluación de respuesta a dosis de dos formulaciones de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros en ratones que portan xenoinjertos WSU-DLCL2.

La Figura 6 muestra una evaluación del peso corporal del animal en respuesta a dosis en ratones que portan xenoinjertos WSU-DLCL2 tratados con dos formulaciones de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros.

30 La Figura 7 muestra el efecto de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros en el tamaño de tumores de xenoinjertos PC-3 en ratones desnudos.

La Figura 8 muestra el efecto de SEC ID N°: 1251 secuestrada en liposomas anfóteros en la velocidad de crecimiento de tumores de xenoinjertos PC-3 en ratones desnudos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada a continuación, y de las reivindicaciones.

35 **Breve descripción de las secuencias**

SEC ID N°: 1249	Región cadena arriba de <i>bcl-2</i>
SEC ID N°: 1250	Oligómero de ADNi PNT-100 metilado
SEC ID N°: 1251	Oligómero de ADNi PNT-100

Descripción detallada

I. Definiciones

Para facilitar el entendimiento de la invención, se definen a continuación varios términos.

40 Como se usa en el presente documento el carácter "anfótero" se refiere a una estructura, que es una sustancia individual (por ejemplo, un compuesto) o una mezcla de sustancias (por ejemplo, una mezcla de dos o más compuestos) o un complejo supramolecular (por ejemplo, un liposoma) que comprenden grupos cargados de carácter tanto aniónico como catiónico en los que

- (i) al menos uno de los grupos cargados tiene una pK entre 4 y 8,
- (ii) la carga catiónica prevalece a pH 4 y
- 45 (iii) la carga aniónica prevalece a pH 8,

dando como resultado un punto isoeléctrico de carga neta neutra entre pH 4 y pH 8. El carácter anfótero por esa definición es diferente del carácter zwitteriónico, ya que los zwitteriones no tienen una pK en el intervalo mencionado

anteriormente. En consecuencia, los zwitteriones están esencialmente cargados de forma neutra sobre un intervalo de valores de pH. La fosfatidilcolina o fosfatidiletanolamina son lípidos neutros con carácter zwitteriónico.

5 Como se usa en el presente documento, "Pares de Lípidos de Anfótero I" se refiere a pares de lípidos que contienen un catión estable y un anión cargable. Los ejemplos incluyen sin limitación DDAB/CHEMS, DOTAP/CHEMS y DOTAP/DOPS. En algunos aspectos, la relación del porcentaje de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos es menor de 1.

10 Como se usa en el presente documento, "Pares de Lípidos de Anfótero II" se refiere a pares de lípidos que contienen un catión cargable y un anión cargable. Los ejemplos incluyen sin limitación Mo-Chol/CHEMS, DPIM/CHEMS o DPIM/DG-Succ. En algunos aspectos, la relación del porcentaje de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos está entre aproximadamente 5 y 0,2.

Como se usa en el presente documento, "Pares de Lípidos de Anfótero III" se refiere a pares de lípidos que contienen un catión cargable y anión estable. Los ejemplos incluyen sin limitación Mo-Chol/DOPG o Mo-Chol/Chol-SO₄. En una realización, la relación del porcentaje de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos es mayor de 1.

15 Como se usa en el presente documento, "liposoma" se refiere a uno o más lípidos que forman un complejo, habitualmente rodeado por una solución acuosa. Los liposomas son generalmente estructuras esféricas que comprenden ácidos grasos lipídicos, estructuras de tipo bicapa lipídica, vesículas unilamelares y vesículas lipídicas amorfas. Generalmente, los liposomas son membranas de bicapa lipídica completamente cerradas que contienen un volumen acuoso atrapado. Los liposomas pueden ser vesículas unilamelares (que poseen una única membrana bicapa), oligolamelares o multilamelares (una estructura de tipo cebolla caracterizada por múltiples bicapas de membrana, cada una separada de la siguiente por una capa acuosa). Los liposomas de la presente invención también incluyen un oligonucleótido de ADN_i como se define posteriormente, unido a los liposomas o secuestrado en o sobre los liposomas. Las moléculas incluyen, sin limitación, oligonucleótidos de ADN_i y/u otros agentes usados para tratar enfermedades tales como cáncer.

25 Como se usa en el presente documento, un "liposoma anfótero" es un liposoma con un carácter anfótero, como se ha definido anteriormente.

30 Como se usa en el presente documento, secuestrado, secuestrante, o secuestro se refiere a encapsulación, incorporación o asociación de un oligonucleótido de ADN_i, con los lípidos de un liposoma. El oligonucleótido de ADN_i puede estar asociado con la bicapa lipídica o presente en el interior acuoso del liposoma o ambos. Incluye encapsulación en el núcleo acuoso del liposoma. También abarca situaciones en las que parte de o todo el oligonucleótido de ADN_i se localiza en el núcleo acuoso del liposoma y parte fuera del liposoma en la fase acuosa de la suspensión liposomal, donde se localiza parte del oligonucleótido de ADN_i en el núcleo acuoso de liposoma y parte en la parte lipídica del liposoma, o parte que sobresale fuera del exterior liposomal, donde los oligonucleótidos de ADN_i están incluidos parcial o totalmente en la parte lipídica del liposoma, e incluye oligonucleótidos de ADN_i asociados con los liposomas, con todo o parte del oligonucleótido de ADN_i asociado con el exterior del liposoma.

35 Como se usa en el presente documento, un Procedimiento de Carga Pasiva (PLP) es un procedimiento en el que los liposomas se cargan con oligonucleótidos de ADN_i y/o u otras moléculas en el que las cargas de los lípidos no son útiles para unir los oligonucleótidos.

El Procedimiento de Carga Avanzado (ALP) es un procedimiento de intercambio de iones que aprovecha la carga positiva de un lípido a pH ácido para unir los oligonucleótidos de ADN_i.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "animales no humanos" se refiere a todos los animales no humanos incluyendo, sin limitación, vertebrados tales como roedores, primates no humanos, ovinos, bovinos, rumiantes, lagomorfos, porcinos, caprinos, equinos, caninos, felinos, aves, etc.

45 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de ácido nucleico", "secuencia de ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a cualquier molécula que contenga ácido nucleico, incluyendo sin limitación, ADN o ARN. El término polinucleótido o polinucleótidos se refiere en general a cualquier polirribonucleótido o polidesoxirribonucleótido, que puede ser ARN o ADN no modificado o ARN o ADN modificado. Por lo tanto, por ejemplo, polinucleótidos como se usa en el presente documento se refiere a, entre otros, ADN mono y bicatenario, ADN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, ARN mono y bicatenario y ARN que es una mezcla de regiones mono y bicatenarias, moléculas híbridas que comprenden ADN y ARN que pueden ser monocatenarias o, más normalmente, bicatenarias o una mezcla de regiones mono y bicatenarias.

50 Además, "polinucleótido" como se usa en el presente documento se refiere a regiones tricatenarias que comprenden ARN o ADN o tanto ARN como ADN. Las cadenas de tales regiones pueden ser de la misma molécula o de diferentes moléculas. Las regiones pueden incluir todas de una o más de las moléculas, pero más normalmente implican solamente una región de algunas de las moléculas. Una de las moléculas de una región de triple hélice es con frecuencia un oligonucleótido.

El término "polinucleótido", "molécula de ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" incluye ADN o ARN que contienen una o más bases modificadas. Por lo tanto, los ADN o ARN con cadenas principales modificadas con respecto a estabilidad o por otras razones son "polinucleótidos", "moléculas de ácido nucleico" o "secuencias de ácido nucleico" como se entienden esos términos en el presente documento. Los términos también abarcan secuencias que incluyen cualquiera de los análogos de bases conocidos de ADN y ARN.

Se apreciará que se han realizado una gran diversidad de modificaciones a ADN y ARN que cumplen muchos fines útiles conocidos por los expertos en la materia. El término "polinucleótido" como se emplea en el presente documento abarca dichas formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo células sencillas y complejas, entre otras.

Por "secuencia de ácido nucleico aislada" se entiende un polinucleótido que no está inmediatamente contiguo con las secuencias codificantes con las que es inmediatamente contiguo (una en el extremo 5' y una en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del que deriva. El término incluye, por lo tanto, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido de replicación autónoma o virus; o en el ADN genómico de un procarionta o eucariota, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un ADNc) independiente de otras secuencias.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que incluye secuencias codificantes necesarias para la producción de un polipéptido, precursor o ARN (por ejemplo, ARNr, ARNt). El polipéptido puede codificarse por una secuencia codificante de longitud completa o por cualquier parte de la secuencia codificante siempre que se conserve la actividad deseada o propiedades funcionales (por ejemplo, actividad enzimática, unión a ligando, transducción de señal, inmunogenicidad, etc.) del fragmento o longitud completa. El término también abarca la región codificante de un gen estructural y las secuencias que preceden y que siguen a la región codificante (líder y remolque) así como secuencias intermedias (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones). Las secuencias localizadas 5' de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 5'. Las secuencias localizadas 3' o cadena abajo de la región codificante y presentes en el ARNm se denominan secuencias no traducidas 3'. El término "gen" abarca tanto ADNc como formas genómicas de un gen. Una forma genómica o un clon de un gen contienen la región codificante interrumpida con secuencias no codificantes denominadas "intrones" o "regiones intermedias" o "secuencias intermedias". Los intrones son segmentos de un gen que se transcriben en ARN nuclear (ARNhn); los intrones pueden contener elementos reguladores tales como potenciadores. Los intrones se retiran o "se cortan" del transcrito nuclear o primario; los intrones por lo tanto están ausentes en el transcrito de ARN mensajero (ARNm). El ARNm actúa durante la traducción para especificar la secuencia y orden de aminoácidos en un polipéptido naciente.

Como se usa en el presente documento, la expresión "expresión génica" se refiere al procedimiento de convertir información genética codificada en un gen en ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, micro ARN o ARNpn) a través de la "transcripción" del gen (es decir, mediante la acción enzimática de una ARN polimerasa) y para genes que codifican proteínas, en proteína a través de "traducción" de ARNm. La expresión génica puede regularse en muchos estadios en el procedimiento. "Regulación positiva" o "activación" se refiere a regulación que aumenta la producción de los productos de expresión génica (es decir, ARN o proteína), mientras que la "regulación negativa" o "represión" se refiere a regulación que reduce la producción. Las moléculas (por ejemplo, factores de transcripción) que están implicadas en la regulación positiva o regulación negativa se llaman con frecuencia "activadores" y "represores", respectivamente.

Además de contar intrones, las formas genómicas de un gen también pueden incluir secuencias localizadas tanto en el extremo 5' como en el 3' de las secuencias que están presentes en el transcrito de ARN. Estas secuencias se denominan secuencias o regiones "flanqueantes" (estas secuencias flanqueantes se localizan 5' o 3' de las secuencias no traducidas presentes en el transcrito de ARNm). La región flanqueante 5' (o región cadena arriba) puede contener secuencias reguladoras tales como promotores y potenciadores que controlan o influyen en la transcripción del gen. La región flanqueante 3' puede contener secuencias que dirigen la terminación de la transcripción, escisión post transcripcional y poliadenilación.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "molécula de ácido nucleico que codifica", "secuencia de ADN que codifica" y "ADN que codifica" se refieren al orden o secuencia de desoxirribonucleótidos a lo largo de una cadena de ácido desoxirribonucleico. El orden de estos desoxirribonucleótidos determina el orden de aminoácidos a lo largo de la cadena polipeptídica (proteína). La secuencia de ADN codifica por lo tanto la secuencia de aminoácidos.

El término "oligonucleótido" como se usa en el presente documento se define como una molécula con dos o más desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, con frecuencia más de tres, y habitualmente más de diez. El tamaño exacto de un oligonucleótido dependerá de muchos factores, incluyendo la función última o uso del oligonucleótido. Los oligonucleótidos pueden prepararse por cualquier procedimiento adecuado, incluyendo, por ejemplo, clonación y restricción de secuencias apropiadas y síntesis química directa por un procedimiento tal como el procedimiento de fosfotriéster de Narang y col., 1979, Meth. Enzymol., 68: 90-99; el procedimiento de fosfodiéster de Brown y col., 1979, Method Enzymol., 68: 109-151, el procedimiento de dietilfosforamidita de Beaucage y col., 1981, Tetrahedron

Let., 22: 1859-1862; el procedimiento de triéster de Matteucci y col., 1981, J. Am. Chem. Soc., 103: 3185-3191, o procedimientos de síntesis automática; y el procedimiento de soporte sólido de la Patente de Estados Unidos N° 4.458.066.

5 Como se usa en el presente documento, un "oligonucleótido de ADN_i" o "ADN_i" se refiere a un oligonucleótido de ácido nucleico monocatenario o derivado del mismo, cuya secuencia es complementaria, en parte, de una parte de la región no transcrita más larga de un gen en el que el oligonucleótido afecta indirecta o directamente a la expresión, regulación o producción del mismo o diferente gen, en el que la región no transcrita más larga incluye cualquier parte del gen que no se transcriba cuando el sitio de inicio de la transcripción sea el sitio más cercano al sitio de inicio de la traducción. El ADN_i no incluye ARN_i y oligonucleótidos antisentido que forman pares de bases
10 solamente con ARN_m o pre ARN_m e interfieren con procesamiento de ARN y/o traducción de mensajeros.

En algunas realizaciones que utilizan oligonucleótidos de ADN_i metilados, el nucleótido, dC se reemplaza por 5-metil-dC cuando sea apropiado, como se enseña por la presente invención.

15 Los oligonucleótidos de ADN_i pueden comprender, sin limitación, miméticos de oligonucleótidos tales como se describen posteriormente. Los compuestos oligonucleotídicos de ADN_i de acuerdo con la presente invención pueden comprender de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 bases nucleicas (es decir, de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 bases unidas), aunque secuencias tanto más largas como más cortas pueden encontrar uso con la presente invención.

20 Los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de bases nucleicas (con frecuencia denominadas en la técnica simplemente "bases"). Como se usa en el presente documento, las bases nucleicas "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases de purina adenina (A) y guanina (G) y las bases de pirimidina timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las bases nucleicas modificadas incluyen otras bases nucleicas sintéticas y naturales.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADN_i pueden hibridar con la región promotora de un gen. En algunas realizaciones, la hibridación del oligonucleótido de ADN_i con el promotor inhibe la expresión del gen.

25 Por "promotor" se entiende una secuencia suficiente para dirigir la transcripción, incluyendo elementos promotores que son suficientes para hacer a la expresión génica dependiente de promotor controlable para específica de tipo celular, específica de tejido o inducible por señales o agentes externos; dichos elementos pueden localizarse en las regiones 5' o 3' del gen. En la definición se incluyen promotores tanto constitutivos como inducibles (véase, por ejemplo, Bitter y col., Methods in Enzymology 153: 516-544, 1987). Por ejemplo, cuando se clonan en sistemas bacterianos, pueden usarse promotores inducibles tales como pL de bacteriófago γ , plac, ptrp, ptac (promotor híbrido de ptrp-lac) y similares. Cuando se clonan en sistemas de células de mamífero, pueden usarse promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, la repetición terminal larga de retrovirus; el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K de virus vaccinia). Los promotores producidos por ADN recombinante o técnicas sintéticas también se definen como promotores.
30

35 Como se usa en el presente documento, la "región reguladora" de un gen es cualquier parte de un gen que regule la expresión de un gen, incluyendo, sin limitación, regulación transcripcional y traduccional. Las regiones incluyen sin limitación las regiones 5' y 3' de genes, sitios de unión para factores reguladores, incluyendo sin limitación sitios de unión a factor de transcripción. Las regiones también incluyen regiones que son de hasta 20.000 o más pares de bases cadena arriba o cadena debajo de sitios de inicio de la traducción, siempre que la región esté implicada de cualquier manera en la regulación de la expresión del gen. La región puede ser tan corta como de 20 pares de bases o tan larga como de miles de pares de bases.
40

45 Por "transformación" o "transfección" se entiende un cambio genético permanente o transitorio inducido en una célula después de la incorporación de ADN nuevo (es decir, ADN exógeno a la célula). Cuando la célula es una célula de mamífero, se consigue generalmente un cambio genético permanente mediante introducción del ADN en el genoma de la célula.

Por "célula transformada" o "célula huésped" se entiende una célula (por ejemplo procarionota o eucarionota) en la que (o en un precursor de la que) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, una molécula de ADN que codifica un polipéptido de la invención (es decir, un polipéptido Matusalén), o fragmento del mismo.

50 La transformación de una célula huésped con ADN recombinante puede llevarse a cabo por técnicas convencionales como se conocen bien por los expertos en la materia. Cuando el huésped es procarionota, tal como *E. coli*, pueden prepararse células competentes que sean capaces de captación de ADN a partir de células recogidas después de la fase de crecimiento exponencial y tratadas posteriormente por el procedimiento de CaCl₂ por procedimientos bien conocidos en la técnica. Como alternativa, puede usarse MgCl₂ o RbCl. La transformación también puede realizarse después de formar un protoplasto de la célula huésped o por electroporación.

55 Como se usan en el presente documento, los términos "complementario" o "complementariedad" se usan en referencia a polinucleótidos (es decir, una secuencia de nucleótidos) relacionados por las reglas de formación de pares de bases. Por ejemplo, para la secuencia "A-G-T", es complementaria la secuencia "T-C-A". La

complementariedad puede ser "parcial", porque solamente algunas de las bases de ácidos nucleicos coinciden de acuerdo con las reglas de formación de pares de base. O puede haber complementariedad "completa" o "total" entre los ácidos nucleicos. El grado de complementariedad entre las cadenas de ácido nucleico tiene efectos significativos en la eficacia y fuerza de hibridación entre cadenas de ácido nucleico.

- 5 Como se usa en el presente documento, la expresión "completamente complementario", por ejemplo cuando se usa en referencia a un oligonucleótido de ADN_i de la presente invención se refiere a un oligonucleótido en el que todos los nucleótidos son complementarios de una secuencia diana (por ejemplo, un gen).

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "parcialmente complementaria", se refiere a una secuencia en la que al menos un nucleótido no es complementario de la secuencia diana. Son secuencias parcialmente complementarias preferidas las que aún pueden hibridar con la secuencia diana en condiciones fisiológicas. La expresión "parcialmente complementario" se refiere a secuencias que tienen regiones de uno o más nucleótidos no complementarios tanto internas a la secuencia como en uno de los extremos. Las secuencias con emparejamientos erróneos en los extremos aún pueden hibridar con la secuencia diana.

15 El término "homología" se refiere a un grado de complementariedad. Puede haber homología parcial u homología completa (es decir, identidad). Una secuencia parcialmente complementaria es una molécula de ácido nucleico que inhibe al menos parcialmente que una molécula de ácido nucleico completamente complementaria hibride con un ácido nucleico que es "sustancialmente homólogo". La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación de solución y similares) en condiciones de rigurosidad baja. Una secuencia
20 sustancialmente homóloga o sonda competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga con una diana en condiciones de baja rigurosidad. De forma similar, una secuencia sustancialmente complementaria o sonda competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente complementaria con una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no significa que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las
25 condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede ensayarse mediante el uso de una segunda diana que es sustancialmente no complementaria (por ejemplo, menos de aproximadamente 30 % de identidad); en ausencia de unión no específica la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.

30 Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico bicatenaria tal como un ADN_c o clon genómico, la expresión "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con una o ambas cadenas de la secuencia de ácido nucleico bicatenaria en condiciones de baja rigurosidad como se ha descrito anteriormente.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico monocatenaria, la expresión "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar (es decir, sea el complemento de) la secuencia de ácido nucleico monocatenaria en condiciones de baja rigurosidad como se ha descrito anteriormente.

35 Como se usa en el presente documento, el término "hibridación" se usa en referencia al emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios. La hibridación y la fuerza de hibridación (es decir, la fuerza de la asociación entre los ácidos nucleicos) se ve afectada por factores tales como el grado de complementariedad entre los ácidos nucleicos, rigurosidad de las condiciones implicadas, la T_m del híbrido formado, y la relación G:C dentro de los ácidos nucleicos. Se dice que una molécula individual que contiene emparejamiento de ácidos nucleicos complementarios
40 dentro de su estructura está "autohibridada".

Como se usa en el presente documento, el término " T_m " se usa en referencia a la "temperatura de fusión". La temperatura de fusión es la temperatura a la que una población de moléculas de ácido nucleico bicatenarias se disocia a la mitad en cadenas individuales. La ecuación para calcular la T_m de ácidos nucleicos se conoce bien en la técnica. Como se indica por referencias convencionales, una estimación sencilla del valor de T_m puede calcularse
45 mediante la ecuación $T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ de G} + \text{C})$, cuando un ácido nucleico está en solución acuosa a NaCl 1 M (Véase por ejemplo, Anderson y Young, Quantitative Filter Hybridization, en Nucleic Acid Hybridization (1985)). Otras referencias incluyen computaciones más sofisticadas que tienen en cuenta características estructurales así como de secuencia para el cálculo de T_m .

50 La inhibición de la hibridación de la secuencia completamente complementaria con la secuencia diana puede examinarse usando un ensayo de hibridación (transferencia de Southern o Northern, hibridación de solución y similares) en condiciones de baja rigurosidad. Una secuencia sustancialmente homóloga o sonda competirá por e inhibirá la unión (es decir, la hibridación) de una molécula de ácido nucleico completamente homóloga con una diana en condiciones de baja rigurosidad. Esto no significa que las condiciones de baja rigurosidad sean tales que se permita la unión no específica; las condiciones de baja rigurosidad requieren que la unión de dos secuencias entre sí
55 sea una interacción específica (es decir, selectiva). La ausencia de unión no específica puede ensayarse mediante el uso de una segunda diana que es sustancialmente no complementaria (por ejemplo, menos de aproximadamente un 30 % de identidad); en ausencia de unión no específica la sonda no hibridará con la segunda diana no complementaria.

Cuando se usa en referencia a una secuencia de ácido nucleico bicatenaria tal como un ADNc o clon genómico, la expresión "sustancialmente homólogo" se refiere a cualquier sonda que pueda hibridar con una o ambas cadenas de la secuencia de ácido nucleico bicatenaria en condiciones de baja rigurosidad como se ha descrito anteriormente.

5 Como se usa en el presente documento el término "rigurosidad" se usa en referencia a las condiciones de temperatura, fuerza iónica y la presencia de otros compuestos tales como disolventes orgánicos, en las que se realizan hibridaciones de ácido nucleico. En "condiciones de baja rigurosidad" una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará con su complemento exacto, secuencias con emparejamientos erróneos de una sola base, secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, secuencias con un 90 % o más de homología) y secuencias que tengan solamente homología parcial (por ejemplo, secuencias con un 50-90 % de homología). En "condiciones de rigurosidad media", una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará solamente con su complemento exacto, secuencias con emparejamientos erróneos de una única base, y secuencias estrechamente relacionadas (por ejemplo, 90 % o más de homología). En "condiciones de alta rigurosidad", una secuencia de ácido nucleico de interés hibridará solamente con su complemento exacto y (dependiendo de las condiciones tales como la temperatura) secuencias con emparejamientos erróneos de una única base. En otras palabras, en condiciones de alta rigurosidad la temperatura puede elevarse para excluir hibridación con secuencias con emparejamientos erróneos de una única base.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones fisiológicas" se refiere a condiciones de rigurosidad específicas que se aproximan o son condiciones dentro de un animal (por ejemplo, un ser humano). Las condiciones fisiológicas ejemplares para su uso *in vitro* incluyen, pero sin limitación, 37 °C, aire al 95 %, CO₂ al 5 %, medio comercial para cultivo de células de mamífero (por ejemplo, medio DMEM disponible de Gibco, MD), suero al 5-10 % (por ejemplo, suero de ternero o suero de caballo), tampones adicionales y opcionalmente hormonas (por ejemplo, insulina y factor de crecimiento epidérmico).

25 El término "aislado" significa alterado "por la mano del hombre" de su estado natural; es decir, si aparece en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su ambiente original o ambos. Por ejemplo, cuando se usa en relación con un ácido nucleico, como en "un nucleótido aislado" o "polinucleótido aislado" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que se identifica y separa de al menos un componente o contaminante con el que está asociado habitualmente en su fuente natural. El ácido nucleico aislado como tal se presenta en una forma o situación que es diferente de la que se encuentra en la naturaleza. Por el contrario, los ácidos nucleicos no aislados son ácidos nucleicos tales como ADN y ARN hallados en el estado en el que existen en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de ADN dada (por ejemplo, un gen) se encuentra en el cromosoma de la célula huésped en proximidad a genes cercanos; las secuencias de ARN, tales como una secuencia de ARNm específica que codifica una proteína específica, se encuentran en la célula como una mezcla con numerosos otros ARNm que codifican multitud de proteínas. Sin embargo, el ácido nucleico aislado que codifica una proteína dada incluye, por ejemplo, dicho ácido nucleico en células que expresan de forma habitual la proteína dada cuando el ácido nucleico está en una localización cromosómica diferente de la de células naturales, o está flanqueado de otro modo por una secuencia de ácido nucleico diferente a la que se encuentra en la naturaleza. El ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado puede estar presente en forma monocatenaria o bicatenaria. Cuando un ácido nucleico, oligonucleótido o polinucleótido aislado va a usarse para expresar una proteína, el oligonucleótido o polinucleótido contendrá como mínimo la cadena con sentido o codificante (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser monocatenario), pero puede contener las cadenas tanto sentido como antisentido (es decir, el oligonucleótido o polinucleótido puede ser bicatenario).

45 Como se usa en el presente documento, el término "purificado" o "purificar" se refiere a retirar componentes (por ejemplo, contaminantes) de una muestra. Por ejemplo, los polipéptidos recombinantes se expresan en células huésped bacterianas y los polipéptidos se purifican retirando proteínas de células huésped; el porcentaje de polipéptidos recombinantes aumenta por lo tanto en la muestra.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cultivo celular" se refiere a cualquier cultivo de células *in vitro*. Se incluyen dentro de esta expresión líneas celulares continuas (por ejemplo, con un fenotipo inmortal), cultivos celulares primarios, líneas celulares transformadas, líneas celulares finitas (por ejemplo, células no transformadas) y cualquier otra población celular mantenida *in vitro*.

50 Como se usa, el término "eucariota" se refiere a organismos distinguibles de "procariotas". Se pretende que el término abarque todos los organismos con células que muestren las características habituales de eucariotas, tales como la presencia de un verdadero núcleo limitado por una membrana nuclear, dentro de la que quedan los cromosomas, la presencia de orgánulos limitados por membrana y otras características observadas habitualmente en organismos eucariotas. Por lo tanto, el término incluye, pero sin limitación, organismos tales como hongos, protozoos y animales (por ejemplo, seres humanos).

55 Como se usa en el presente documento, la expresión "*in vitro*" se refiere a un ambiente artificial y a procesos o reacciones que se producen dentro de un ambiente artificial. Los ambientes *in vitro* pueden consistir en, pero sin limitación, tubos de ensayo y cultivo celular. La expresión "*in vivo*" se refiere al ambiente natural (por ejemplo, un animal o una célula) y a procesos o reacción que se producen dentro de un ambiente natural.

Como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones tales que se inhíba la expresión de un gen" se refiere a condiciones en las que un oligonucleótido de ADN_i de la presente invención hibrida con un gen (por ejemplo, la región promotora del gen) e inhíbe la transcripción del gen en al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 % o al menos el 90 % en relación con el nivel de transcripción en ausencia del oligonucleótido.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "en condiciones tales que se reduzca el crecimiento de una célula" se refiere a condiciones en las que un oligonucleótido de ADN_i de la presente invención, cuando se administra a una célula (por ejemplo, un cáncer) reduce la tasa de crecimiento de la célula en al menos el 10 %, al menos el 25 %, al menos el 50 % o al menos el 90 % en relación con la tasa de crecimiento de la célula en ausencia del oligonucleótido.

10 Las expresiones "compuesto de ensayo" y "compuesto candidato" se refieren a cualquier entidad química, producto farmacéutico, fármaco, producto biológico y similares que es un candidato para su uso para tratar o prevenir una enfermedad, dolencia, malestar o trastorno de la función corporal (por ejemplo, cáncer). Los compuestos de ensayo incluyen compuestos terapéuticos tanto conocidos como potenciales. Puede determinarse que un compuesto de ensayo es terapéutico mediante exploración usando los procedimientos de exploración de la presente invención. En algunas realizaciones de la presente invención, la mezcla incluye un oligonucleótido de ADN_i, un compuesto de ensayo tal como un compuesto antisentido o un agente quimioterapéutico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agentes quimioterapéuticos" se refiere a compuestos que pueden ser útiles en el tratamiento de una enfermedad (por ejemplo, cáncer). Los agentes quimioterapéuticos ejemplares eficaces contra el cáncer incluyen, sin limitación, daunorrubicina, dactinomicina, doxorubicina, bleomicina, mitomicina, mostaza de nitrógeno, clorambucilo, melfalán, ciclofosfamida, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina (CA), 5-fluorouracilo (5-FU), floxuridina (5-FUdR), metotrexato (MTX), colchicina, taxotere, vincristina, vinblastina, etopósido, tenipósido, cisplatino y dietilestilbestrol (DES).

Para los fines de la presente invención, los elementos químicos se identifican de acuerdo con la Tabla Periódica de los Elementos, versión CAS, Handbook of Chemistry and Physics, 75^a Ed. Adicionalmente, se describen principios generales de química orgánica en "Organic Chemistry", Thomas Sorrell, University Science Books, Sausalito: 1999, y "March's Advanced Organic Chemistry", 5^a Ed., Ed.: Smith, M. B. y March, J., John Wiley & Sons, Nueva York: 2001.

Como se usa en el presente documento, el término "alifático" abarca los términos alquilo, alquenilo, alquinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente como se expone posteriormente.

30 Como se usa en el presente documento, un grupo "alquilo" se refiere a un grupo de hidrocarburo alifático saturado que contiene 1-8 (por ejemplo, 1-6 o 1-4) átomos de carbono. Un grupo alquilo puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos de grupos alquilo incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, sec-butilo, terc-butilo, n-pentilo, n-heptilo o 2-etilhexilo. Un grupo alquilo puede sustituirse (es decir, sustituirse opcionalmente) con uno o más sustituyentes tales como halo, cicloalifático, heterocicloalifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, aroilo, heteroarilo, cicloalifaticocarbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, nitro, ciano, amino, amido, acilo, sulfonilo, sulfinilo, sulfanilo, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, carboxi, carbamoilo, cicloalifaticoxi, heterocicloalifaticoxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, heteroarilalcoxi o hidroxilo. Sin limitación, algunos ejemplos de alquilo sustituidos incluyen carboxialquilo (tal como HOOC-alquilo, alcocarbonilalquilo y alquilcarbonilalquilo), cianoalquilo, hidroxialquilo, alcocalquilo, acilalquilo, hidroxialquilo, aralquilo, (alcoxiaril)alquilo, (sulfonilamino)alquilo (tal como (alquilsulfonilamino)alquilo), aminoalquilo, amidoalquilo, (cicloalifático)alquilo, cianoalquilo o haloalquilo.

Como se usa en el presente documento, un grupo "alquenilo" se refiere a un grupo de carbono alifático que contiene 2-8 (por ejemplo, 2-6 o 2-4) átomos de carbono y al menos un doble enlace. Como un grupo alquilo, un grupo alquenilo puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos de un grupo alquenilo incluyen, pero sin limitación, alilo, isoprenilo, 2-butenilo y 2-hexenilo. Un grupo alquenilo puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes tales como halo, cicloalifático, heterocicloalifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, aroilo, heteroarilo, (cicloalifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, nitro, ciano, amino, amido, acilo, sulfonilo, sulfinilo, sulfanilo, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, carboxi, carbamoilo, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, (heteroaril)alcoxi o hidroxilo.

Como se usa en el presente documento, un grupo "alquinilo" se refiere a un grupo de carbono alifático que contiene 2-8 (por ejemplo, 2-6 o 2-4) átomos de carbono y tiene al menos un triple enlace. Un grupo alquinilo puede ser lineal o ramificado. Los ejemplos de un grupo alquinilo incluyen, pero sin limitación, propargilo y butinilo. Un grupo alquinilo puede sustituirse opcionalmente con uno o más sustituyentes tales como halo, cicloalifático, heterocicloalifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, aroilo, heteroarilo, (cicloalifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, nitro, ciano, amino, amido, acilo, sulfonilo, sulfinilo, sulfanilo, sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, carboxi, carbamoilo, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi, ariloxi, heteroariloxi, aralquilo, (heteroaril)alcoxi o hidroxilo.

Como se usa en el presente documento, un "amido" abarca tanto "aminocarbonilo" como "carbonilamino". Estos términos cuando se usan solos o en relación con otro grupo se refieren a un grupo amido tal como N(R^X)₂-C(O)- o R^YC(O)-N(R^X)₂- cuando se usan de forma terminal y -C(O)-N(R^X)- o -N(R^X)-C(O)- cuando se usan de forma interna,

en los que R^X y R^Y se definen posteriormente. Los ejemplos de grupos amido incluyen alquilamido (tal como alquilcarbonilamino y alquilcarbonilamino), (heterocicloalifático)amido, (heteroaralquil)amido, (heteroaril)amido, (heterocicloalquil)alquilamido, arilamido, aralquilamido, (cicloalquil)alquilamido y cicloalquilamido.

5 Como se usa en el presente documento, un grupo "amino" se refiere a -NR^XR^Y en el que cada uno de R^X y R^Y es de forma independiente hidrógeno, alquilo, cicloalifático, (cicloalifático)alifático, arilo, aralifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático)alifático, heteroarilo, carboxi, sulfanilo, sulfinilo, sulfonilo, (alifático)carbonilo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, arilcarbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo, (heteroaril)carbonilo o (heteroaralifático)carbonilo, definiéndose cada uno de los cuales en el presente documento y opcionalmente
10 sustituyéndose. Los ejemplos de grupos amino incluyen alquilamino, dialquilamino y arilamino.

Cuando el término "amino" no es el grupo terminal (por ejemplo alquilcarbonilamino), este se representa por -NR^X-. R^X tiene el mismo significado que se ha definido anteriormente.

15 Como se usa en el presente documento, un grupo "arilo" usado solo o con parte de un resto mayor como en "aralquilo", "aralcoxi" o "ariloxialquilo" se refiere a monocíclico (por ejemplo, fenilo); bicíclico (por ejemplo, indenilo, naftalenilo, tetrahidronaftilo, tetrahidroindenilo); y tricíclico (por ejemplo, fluorenil tetrahidrofluorenilo o tetrahidroantraceno, antraceno). Los grupos bicíclico y tricíclico incluyen anillos carbocíclicos de 2-3 miembros benzofusionados. Por ejemplo, un grupo benzofusionado incluye fenilo fusionado con dos o más restos carbocíclicos C₄₋₈. Un arilo se sustituye opcionalmente con uno o más sustituyentes incluyendo alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno o alquino]; cicloalifático; (cicloalifático)alifático; heterocicloalifático; (heterocicloalifático)alifático; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroarilo; amino; oxo (en un anillo carbocíclico no aromático de un arilo bicíclico o tricíclico benzofusionado); nitro; carboxi; amido; acilo [por ejemplo, alifaticocarbonilo; (cicloalifático)carbonilo; ((cicloalifático)alifático)carbonilo; (aralifático)carbonilo; (heterocicloalifático)carbonilo; ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo; y (heteroaralifático)carbonilo]; sulfonilo [por ejemplo, alifaticosulfonilo y aminosulfonilo]; sulfinilo [por ejemplo alifaticosulfinilo]; sulfanilo [por ejemplo, alifaticosulfanilo]; nitro; ciano; halo; hidroxilo; mercapto; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamilo; sulfamida; y carbamilo. Como alternativa, un arilo puede no estar sustituido.

20 Los ejemplos no limitantes de arilos sustituidos incluyen haloarilo [por ejemplo, mono-, di (tal como p,m-dihaloarilo) y (trihalo)arilo]; (carboxi)arilo [por ejemplo, (alcoxicarbonil)arilo, ((aralquil)carboniloxi)arilo, y (alcoxicarbonil)arilo]; (amido)arilo [por ejemplo, (aminocarbonil)arilo, (((alquilamino)alquil)aminocarbonil)arilo, (alquilcarbonil)aminoarilo, (arilaminocarbonil)arilo, y (((heteroaril)amino)carbonil)arilo]; aminoarilo [por ejemplo, ((alquilsulfonil)amino)arilo y ((dialquil)amino)arilo]; (cianoalquil)arilo; (alcoxi)arilo; (sulfamilo)arilo [por ejemplo, (aminosulfonil)arilo]; (alquilsulfonil)arilo; (ciano)arilo; (hidroxialquil)arilo; ((alcoxi)alquil)arilo; (hidroxil)arilo, ((carboxi)alquil)arilo; (((dialquil)amino)alquil)arilo; (nitroalquil)arilo; (((alquilsulfonil)amino)alquil)arilo; ((heterocicloalifático)carbonil)arilo; ((alquilsulfonil)alquil)arilo; (cianoalquil)arilo; (hidroxialquil)arilo; (alquilcarbonil)arilo; alquilarilo; (trihaloalquil)arilo; p-amino-*m*-alcoxicarbonilarilo; *p*-amino-*m*-cianoarilo; *p*-halo-*m*-aminoarilo; y (*m*-(heterocicloalifático)-*o*-(alquil)arilo.

30 Como se usa en el presente documento, un grupo "aralifático" tal como un "aralquilo" se refiere a un grupo alifático (por ejemplo, un grupo alquilo C₁₋₄) que está sustituido con un grupo arilo. "Alifático", "alquilo" y "arilo" se definen en el presente documento. Un ejemplo de un aralifático tal como un grupo aralquilo es bencilo.

40 Como se usa en el presente documento, un "sistema de anillo bicíclico" incluye estructuras de 8-12 (por ejemplo, 9, 10 u 11) miembros que forman dos anillos, en las que los dos anillos tienen al menos un átomo en común (por ejemplo, 2 átomos en común). Los sistemas de anillo bicíclico incluyen bicicloalifáticos (por ejemplo, bicicloalquilo o bicicloalqueno), bicicloheteroalifáticos, arilos bicíclicos, y heteroarilos bicíclicos.

Como se usa en el presente documento, un grupo "cicloalifático" abarca un grupo "cicloalquilo" y un grupo "cicloalqueno", cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido como se expone más adelante.

45 Como se usa en el presente documento, un grupo "cicloalquilo" se refiere a un anillo de 3-10 (por ejemplo, 5-10) átomos de carbono (condensado o enlazado) mono- o bicíclico, carbocíclico saturado. Los ejemplos de grupos cicloalquilo incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, cicloheptilo, adamantilo, norbornilo, cubilo, octahidro-indenilo, decahidro-naftilo, biciclo[3.2.1]octilo, biciclo[2.2.2]octilo, biciclo[3.3.1]nonilo, biciclo[3.3.2]decilo, biciclo[2.2.2]octilo, adamantilo, azacicloalquilo, o ((aminocarbonil)cicloalquil)cicloalquilo. Un grupo "cicloalqueno", como se usa en el presente documento, se refiere a un anillo carbocíclico no aromático de 3-10 (por ejemplo, 4-8) átomos de carbono que tiene uno o más dobles enlaces. Los ejemplos de grupos cicloalqueno incluyen ciclopentenilo, 1,4-ciclohexa-di-enilo, cicloheptenilo, ciclooctenilo, hexahidro-indenilo, octahidro-naftilo, ciclohexenilo, ciclopentenilo, biciclo[2.2.2]octenilo, y biciclo[3.3.1]nonenilo.

55 Un grupo cicloalquilo o cicloalqueno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno, o alquino], cicloalifático, (cicloalifático) alifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático) alifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi, ariloxi, heteroariloxi, (aralifático)oxi, (heteroaralifático)oxi, aroilo, heteroarilo, amino, amido [por ejemplo, (alifático)carbonilamino, (cicloalifático)carbonilamino, ((cicloalifático)alifático)carbonilamino, (aril)carbonilamino, (aralifático)carbonilamino,

(heterocicloalifático)carbonilamino, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilamino, (heteroaril)carbonilamino, y (heteroaralifático)carbonilamino], nitro, carboxi [por ejemplo, HOOC-, alcoxicarbonilo, y alquilcarboniloxi], acilo [por ejemplo, (cicloalifático)carbonilo, ((cicloalifático)alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático) carbonilo, y (heteroaralifático)carbonilo], nitro, ciano, halo, hidroxilo, mercapto, sulfonilo [por ejemplo, alquilsulfonilo y aril-sulfonilo], sulfínico [por ejemplo, alquilsulfínico], sulfanilo [por ejemplo, alquilsulfanilo], sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, o carbamoilo.

Como se usa en el presente documento, "resto cíclico" incluye cicloalifático, heterocicloalifático, arilo, o heteroarilo, cada uno de los cuales se ha definido previamente.

Como se usa en el presente documento, el término "heterocicloalifático" abarca un grupo heterocicloalquilo y un grupo heterocicloalqueno, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido como se expone más adelante.

Como se usa en el presente documento, un grupo "heterocicloalquilo" se refiere a una estructura de anillo saturado de 3-10 miembros mono- o bicíclico (condensado o enlazado) (por ejemplo, mono- o bicíclico de 5 a 10 miembros), en la que uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, o combinaciones de los mismos). Los ejemplos de un grupo heterocicloalquilo incluyen piperidilo, piperazilo, tetrahidropirano, tetrahidrofurilo, 1,4-dioxolanilo, 1,4-ditiano, 1,3-dioxolanilo, oxazolidilo, isoxazolidilo, morfolinilo, tiomorfolilo, octahidro-benzofurilo, octahidro-cromenilo, octahidro-tiocromenilo, octahidro-indolilo, octahidro-piridinilo, decahidro-quinolinilo, octahidro-benzo[*b*]tiofenilo, 2-oxa-biciclo[2.2.2]octilo, 1-aza-biciclo[2.2.2]octilo, 3-aza-biciclo[3.2.1]octilo, y 2,6-dioxa-triciclo[3.3.1.0^{3,7}]nonilo. Un grupo heterocicloalquilo monocíclico puede estar condensado con un resto fenilo tal como tetrahidroisoquinolina. Un grupo "heterocicloalqueno", como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de anillo no aromático mono- o bicíclico (por ejemplo, mono- o bicíclico de 5 a 10 miembros) que tiene uno o más dobles enlaces, y en la que uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O, o S). Los heteroalifáticos monocíclicos y bicíclicos se numeran de acuerdo con la nomenclatura química convencional.

Un grupo heterocicloalquilo o heterocicloalqueno puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno, o alquino], cicloalifático, (cicloalifático) alifático, heterocicloalifático, (heterocicloalifático) alifático, arilo, heteroarilo, alcoxi, (cicloalifático)oxi, (heterocicloalifático)oxi, ariloxi, heteroariloxi, (aralifático)oxi, (heteroaralifático)oxi, aroilo, heteroaróilo, amino, amido [por ejemplo, (alifático)carbonilamino, (cicloalifático) carbonilamino, ((cicloalifático) alifático)carbonilamino, (aril)carbonilamino, (aralifático)carbonilamino, (heterocicloalifático)carbonilamino, ((heterocicloalifático) alifático)carbonilamino, (heteroaril)carbonilamino, y (heteroaralifático)carbonilamino], nitro, carboxi [por ejemplo, HOOC-, alcoxicarbonilo, y alquilcarboniloxi], acilo [por ejemplo, (cicloalifático) carbonilo, ((cicloalifático) alifático)carbonilo, (aralifático)carbonilo, (heterocicloalifático)carbonilo, ((heterocicloalifático)alifático)carbonilo, y (heteroaralifático)carbonilo], nitro, ciano, halo, hidroxilo, mercapto, sulfonilo [por ejemplo, alquilsulfonilo y arilsulfonilo], sulfínico [por ejemplo, alquilsulfínico], sulfanilo [por ejemplo, alquilsulfanilo], sulfoxi, urea, tiourea, sulfamoilo, sulfamida, oxo, o carbamoilo.

Un grupo "heteroarilo", como se usa en el presente documento, se refiere a una estructura de anillo monocíclica, bicíclica o tricíclica que tiene de 4 a 15 átomos en el anillo, en el que uno o más de los átomos del anillo es un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, o combinaciones de los mismos) y en el que uno o más de los anillos de la estructura de anillo bicíclica o tricíclica es aromático. Un grupo heteroarilo incluye un sistema de anillo benzocondensado que tiene de 2 a 3 anillos. Por ejemplo, un grupo benzocondensado incluye benzocondensado con uno o dos restos heterocicloalifáticos de 4 a 8 miembros (por ejemplo, indolizilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[*b*]furilo, benzo[*b*]tiofenilo, quinolinilo o isoquinolinilo). Algunos ejemplos de heteroarilo son azetidínico, piridilo, 1H-indazolilo, furilo, pirrolilo, tienilo, tiazolilo, oxazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofurilo, isoquinolinilo, benzotiazolilo, xanteno, tioxanteno, fenotiazina, dihidroindol, benzo[1,3]dioxol, benzo[*b*]furilo, benzo[*b*]tiofenilo, indazolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, purilo, cinnolilo, quinolilo, quinazolilo, cinnolilo, ftalazilo, quinazolilo, quinoxalilo, isoquinolinilo, 4H-quinolizilo, benzo-1,2,5-tiadiazolilo, o 1,8-naftiridilo.

Sin limitación, los heteroarilos monocíclicos incluyen furilo, tiofenilo, 2H-pirrolilo, pirrolilo, oxazolilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, isoxazolilo, isotiazolilo, 1,3,4-tiadiazolilo, 2H-pirano, 4H-prano, piridilo, piridazilo, pirimidilo, pirazolilo, pirazilo, o 1,3,5-triazilo. Los heteroarilos monocíclicos se numeran de acuerdo con la nomenclatura química convencional.

Sin limitación, los heteroarilos bicíclicos incluyen indolizilo, indolilo, isoindolilo, 3H-indolilo, indolinilo, benzo[*b*]furilo, benzo[*b*]tiofenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, indazolilo, benzimidazilo, benzotiazolilo, purinilo, 4H-quinolizilo, quinolilo, isoquinolilo, cinnolilo, ftalazilo, quinazolilo, quinoxalilo, 1,8-naftiridilo, o pteridilo. Los heteroarilos bicíclicos se numeran de acuerdo con la nomenclatura química convencional.

Un heteroarilo está opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como alifático [por ejemplo, alquilo, alqueno, o alquino]; cicloalifático; (cicloalifático)alifático; heterocicloalifático; (heterocicloalifático)alifático; arilo; heteroarilo; alcoxi; (cicloalifático)oxi; (heterocicloalifático)oxi; ariloxi; heteroariloxi; (aralifático)oxi; (heteroaralifático)oxi; aroilo; heteroaróilo; amino; oxo (en un anillo carbocíclico o heterocíclico no aromático de un heteroarilo bicíclico o tricíclico); nitro; carboxi; amido; acilo [por ejemplo, alifáticocarbonilo; (cicloalifático)carbonilo; ((cicloalifático)alifático)carbonilo; (aralifático)carbonilo; (heterocicloalifático)carbonilo; ((heterocicloalifático)

alifático)carbonilo; y (heteroaralifático)carbonilo]; sulfonilo [por ejemplo, alifáticosulfonilo y aminosulfonilo]; sulfínilo [por ejemplo, alifáticosulfínilo]; sulfanilo [por ejemplo, alifáticosulfanilo]; nitro; ciano; halo; hidroxilo; mercapto; sulfoxi; urea; tiourea; sulfamoilo; sulfamida; o carbamoilo. Como alternativa, un heteroarilo puede estar no sustituido.

5 Los ejemplos no limitantes de heteroarilos sustituidos incluyen (halo)heteroarilo [por ejemplo, mono- y di-(halo)heteroarilo]; (carboxi)heteroarilo [por ejemplo, (alcoxicarbonil)heteroarilo]; cianoheteroarilo; aminoheteroarilo [por ejemplo, ((alquilsulfonil)amino)heteroarilo y ((dialquil)amino)heteroarilo]; (amido)heteroarilo [por ejemplo, aminocarbonilheteroarilo, ((alquilcarbonil)amino)heteroarilo, (((alquil)amino)alquil)aminocarbonil)heteroarilo, (((heteroaril)amino)carbonil)heteroarilo, ((heterocicloalifático)carbonil)heteroarilo, y ((alquilcarbonil)amino)heteroarilo]; (cianoalquil)heteroarilo; (alcoxi)heteroarilo; (sulfamoil)heteroarilo [por ejemplo, (aminosulfonil)heteroarilo]; (sulfonil)heteroarilo [por ejemplo, (alquilsulfonil)heteroarilo]; (hidroxialquil)heteroarilo; (alcoxialquil)heteroarilo; (hidroxil)heteroarilo; ((carboxi)alquil)heteroarilo; [((dialquil)amino)alquilo]heteroarilo; (heterocicloalifático)heteroarilo; (cicloalifático)heteroarilo; (nitroalquil)heteroarilo; (((alquilsulfonil)amino)alquil)heteroarilo; ((alquil-sulfonil)alquil)heteroarilo; (cianoalquil)heteroarilo; (acil)heteroarilo [por ejemplo, (alquilcarbonil)heteroarilo]; (alquil)heteroarilo, y (haloalquil)heteroarilo [por ejemplo, trihaloalquilheteroarilo].

15 Un "heteroaralifático (tal como un grupo heteroaralquilo) como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alifático (por ejemplo, un grupo alquilo C_{1-4}) que está sustituido con un grupo heteroarilo. "Alifático", "alquilo" y "heteroarilo" se han definido anteriormente.

20 Como se usa en el presente documento, un grupo "acilo" se refiere a un grupo formilo o $R^X-C(O)-$ (tal como -alquil-C(O)-, denominado también "alquilcarbonilo") donde R^X y "alquilo" se han definido previamente. Acetilo y pivaloilo son ejemplos de grupos acilo.

Como se usa en el presente documento, un grupo "alcoxi" se refiere a un grupo alquil-O- donde "alquilo" se ha definido previamente.

25 Como se usa en el presente documento, un grupo "carbamoilo" se refiere a un grupo que tiene la estructura $-O-CO-NR^X R^Y$ o $-NR^X-CO-O-R^Z$ en la que R^X y R^Y se han definido anteriormente y R^Z puede ser alifático, arilo, aralifático, heterocicloalifático, heteroarilo o heteroaralifático.

Como se usa en el presente documento, un grupo "carboxi" se refiere a $-COOH$, $-COOR^X$, $-OC(O)H$, $-OC(O)R^X$ cuando se usa como un grupo terminal o $-OC(O)-$ o $-C(O)O-$; cuando se usa como un grupo interno.

Como se usa en el presente documento, un grupo "haloalifático" se refiere a un grupo alifático sustituido con 1-3 halógenos. Por ejemplo, el término haloalquilo incluye el grupo $-CF_3$.

30 Como se usa en el presente documento, un grupo "mercapto" se refiere a $-SH$.

Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfo" se refiere a $-SO_3H$ o $-SO_3R^X$ cuando se usa terminalmente o $-S(O)_3-$ cuando se usa internamente.

35 Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfamida" se refiere a la estructura $-NR^X-S(O)_2-NR^Y R^Z$ cuando se usa terminalmente y $-NR^X-S(O)_2-NR^Y-$ cuando se usa internamente, en las que R^X , R^Y , y R^Z se han definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfamoilo" se refiere a la estructura $-S(O)_2-NR^X R^Y$ o $-NR^X-S(O)_2-R^Z$ cuando se usa terminalmente o $-S(O)_2-NR^X-$ o $-NR^X-S(O)_2-$ cuando se usa internamente, en las que R^X , R^Y , y R^Z se han definido anteriormente.

40 Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfanilo" se refiere a $-S-R^X$ cuando se usa terminalmente y a $-S-$ cuando se usa internamente, en la que R^X se ha definido anteriormente. Los ejemplos de sulfanilos incluyen alquilsulfanilo.

Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfínilo" se refiere a $-S(O)-R^X$ cuando se usa terminalmente y a $-S(O)-$ cuando se usa internamente, en la que R^X se ha definido anteriormente.

45 Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfonilo" se refiere a $-S(O)_2-R^X$ cuando se usa terminalmente y a $-S(O)_2-$ cuando se usa internamente, en la que R^X se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, un grupo "sulfoxi" se refiere a $-O-SO-R^X$ o $-SO-O-R^X$, cuando se usa terminalmente y a $-O-S(O)-$ o $-S(O)-O-$ cuando se usa internamente, donde R^X se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, un "halógeno" o grupo "halo" se refiere a flúor, cloro, bromo o yodo.

50 Como se usa en el presente documento, un "alcoxicarbonilo", que está abarcado por el término carboxi, usado en solitario o en conexión con otro grupo se refiere a un grupo tal como alquil-O-C(O)-.

Como se usa en el presente documento, un "alcoxilquilo" se refiere a un grupo alquilo tal como alquil-O-alquilo-, en el que el alquilo se ha definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, un "carbonilo" se refiere a -C(O)-.

Como se usa en el presente documento, un "oxo" se refiere a =O.

5 Como se usa en el presente documento, un "aminoalquilo" se refiere a la estructura $(R^X)_2N$ -alquilo-.

Como se usa en el presente documento, un "cianoalquilo" se refiere a la estructura (NC)-alquilo-.

Como se usa en el presente documento, un grupo "urea" se refiere a la estructura $-NR^X-CO-NR^YR^Z$ y un grupo "tiourea" se refiere a la estructura $-NR^X-CS-NR^YR^Z$ cuando se usa terminalmente y a $-NR^X-CO-NR^Y-$ o $-NR^X-CS-NR^Y-$ cuando se usa internamente, en las que R^X , R^Y , y R^Z se han definido anteriormente.

10 Como se usa en el presente documento, un grupo "guanidino" se refiere a la estructura $-N=C(N(R^X R^Y))N(R^X R^Y)$ en la que R^X y R^Y se han definido anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término grupo "amidino" se refiere a la estructura $-C=(NR^X)N(R^X R^Y)$ en la que R^X y R^Y se han definido anteriormente.

Los términos "terminalmente" e "internamente" se refieren a la localización de un grupo dentro de un sustituyente.

15 Un grupo es terminal cuando el grupo está presente en el extremo del sustituyente y no está unido adicionalmente al resto de la estructura química. Carboxialquilo, es decir, $R^XO(O)C$ -alquilo es un ejemplo de un grupo carboxi usado terminalmente. Un grupo es interno cuando el grupo está presente en el medio de un sustituyente respecto al extremo del sustituyente unido al resto de la estructura química. Alquilarcoxi (por ejemplo, alquil-C(O)O- o alquil-OC(O)-) y alquilcarboxiarilo (por ejemplo, alquil-C(O)O-arilo- o alquil-O(CO)-arilo-) son ejemplos de grupos carboxi
20 usados internamente.

La expresión "opcionalmente sustituido" se usa de forma intercambiable con la expresión "sustituido o no sustituido". Como se describe en el presente documento, los compuestos de la invención pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes, tales como los ilustrados de forma general anteriormente, o como se ejemplifica por las clases, subclases y especies particulares de la invención. Como se describe en el presente
25 documento, las variables contenidas en el presente documento abarcan grupos específicos, tales como alquilo y arilo. A menos que se indique de otra manera, cada uno de los grupos específicos para las variables contenidas en el presente documento pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más de los sustituyentes descritos en el presente documento. Cada sustituyente de un grupo específico está opcionalmente sustituido adicionalmente con de uno a tres halo, ciano, oxoalcoxi, hidroxilo, amino, nitro, arilo, haloalquilo, y alquilo. Por ejemplo, un grupo alquilo puede estar sustituido con alquil-sulfanilo y el alquilsulfanilo puede estar opcionalmente sustituido con de uno a tres
30 halo, ciano, oxoalcoxi, hidroxilo, amino, nitro, arilo, haloalquilo, y alquilo. Como un ejemplo adicional, la porción cicloalquilo de un (cicloalquil)carbonilamino puede estar opcionalmente sustituida con de uno a tres halo, ciano, alcoxi, hidroxilo, nitro, haloalquilo, y alquilo. Cuando dos grupos alcoxi están unidos al mismo átomo o a átomos adyacentes, los dos grupos alcoxi pueden formar un anillo junto con el/los átomo/s a los que están unidos.

35 En general, el término "sustituido", esté precedido o no por el término "opcionalmente", se refiere a la sustitución de los radicales hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado. Los sustituyentes específicos se han descrito anteriormente en las definiciones y a continuación en la descripción de compuestos y ejemplos de los mismos. A menos que se indique otra cosa, un grupo opcionalmente sustituido puede tener un sustituyente en cada posición sustituible del grupo, y cuando más de una posición en cualquier estructura dada
40 puede estar sustituida con más de un sustituyente seleccionado entre un grupo especificado, el sustituyente puede ser igual o diferente en cada posición. Un sustituyente en el anillo, tal como un heterocicloalquilo, puede estar unido a otro anillo, tal como un cicloalquilo, para formar un sistema de anillo espiro-bicíclico, por ejemplo, ambos anillos comparten un átomo común. Como reconocerá un experto en la materia, las combinaciones de sustituyentes previstas por la presente invención son aquellas combinaciones que dan como resultado la formación de
45 compuestos estables o químicamente factibles.

La expresión "estable o químicamente factible", como se usa en el presente documento, se refiere a compuestos que no se alteran sustancialmente cuando se someten a condiciones para permitir su producción, detección y, preferentemente, su recuperación, purificación, y uso para uno o más de los fines desvelados en el presente documento.

50 Como se usa en el presente documento, una cantidad eficaz se define como la cantidad requerida para conferir un efecto terapéutico sobre el paciente tratado, y normalmente se determina en base a la edad, área superficial, peso y condición del paciente. La interrelación de dosificaciones para animales y seres humanos (basadas en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) se describe en Freireich y col., Cancer Chemother. Rep., 50: 219 (1966). El área superficial corporal puede determinarse aproximadamente a partir de la altura y el peso del paciente. Véase, por ejemplo, Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardsley, Nueva York, 537 (1970).
55

A menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento pretenden incluir también todas las formas isoméricas (por ejemplo, enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales)) de la estructura; por ejemplo, las configuraciones R y S para cada centro asimétrico, isómeros de dobles enlaces (Z) y (E), e isómeros conformacionales (Z) y (E). Por lo tanto, los isómeros estereoquímicos individuales así como las mezclas enantioméricas, diastereoméricas, y geométricas (o conformacionales) de los presentes compuestos están dentro del alcance de la invención. A menos que se indique otra cosa, todas las formas tautoméricas de los compuestos de la invención están dentro del alcance de la invención. Adicionalmente, a menos que se indique otra cosa, las estructuras representadas en el presente documento pretenden incluir también compuestos que difieren únicamente por la presencia de uno o más átomos isotópicamente enriquecidos. Por ejemplo, los compuestos que tienen las presentes estructuras excepto por la sustitución del hidrógeno por deuterio o tritio, o la sustitución de un carbono por un carbono enriquecido en ^{13}C o ^{14}C también están dentro del alcance de la presente invención. Tales compuestos son útiles, por ejemplo, como herramientas o sondas analíticas en ensayos biológicos.

II. Dianas de oncogenes

15 D. *Bcl-2*

En muchos tipos de tumores humanos, incluyendo linfomas y leucemias, el gen *bcl-2* está sobreexpresado y puede asociarse con tumorigenicidad (Tsujiyama y col., Science 228: 1440-1443 [1985]). Se han descubierto altos niveles de expresión del gen *bcl-2* en todos los linfomas con translocaciones cromosómicas t(14; 18) incluyendo la mayoría de los linfomas de linfocitos B foliculares y muchos linfomas no de Hodgkin de células grandes. También se han descubierto altos niveles de expresión del gen *bcl-2* en ciertas leucemias que no tienen una traslación cromosómica t(14; 18), incluyendo la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica aguda, muchas leucemias linfocíticas del tipo prelinfocitos B, neuroblastomas, carcinomas nasofaríngeos y muchos adenocarcinomas de la próstata, mama y colon. (Reed y col., Cancer Res. 51: 6529 [1991]; Yunis y col., New England J. Med. 320: 1047; Campos y col., Blood 81: 3091-3096 [1993]; McDonnell y col., Cancer Res. 52: 6940-6944 [1992]; Lu y col., Int. J Cancer 53: 29-35 [1993]; Bonner y col., Lab Invest. 68: 43A [1993]).

IV. Abreviaturas

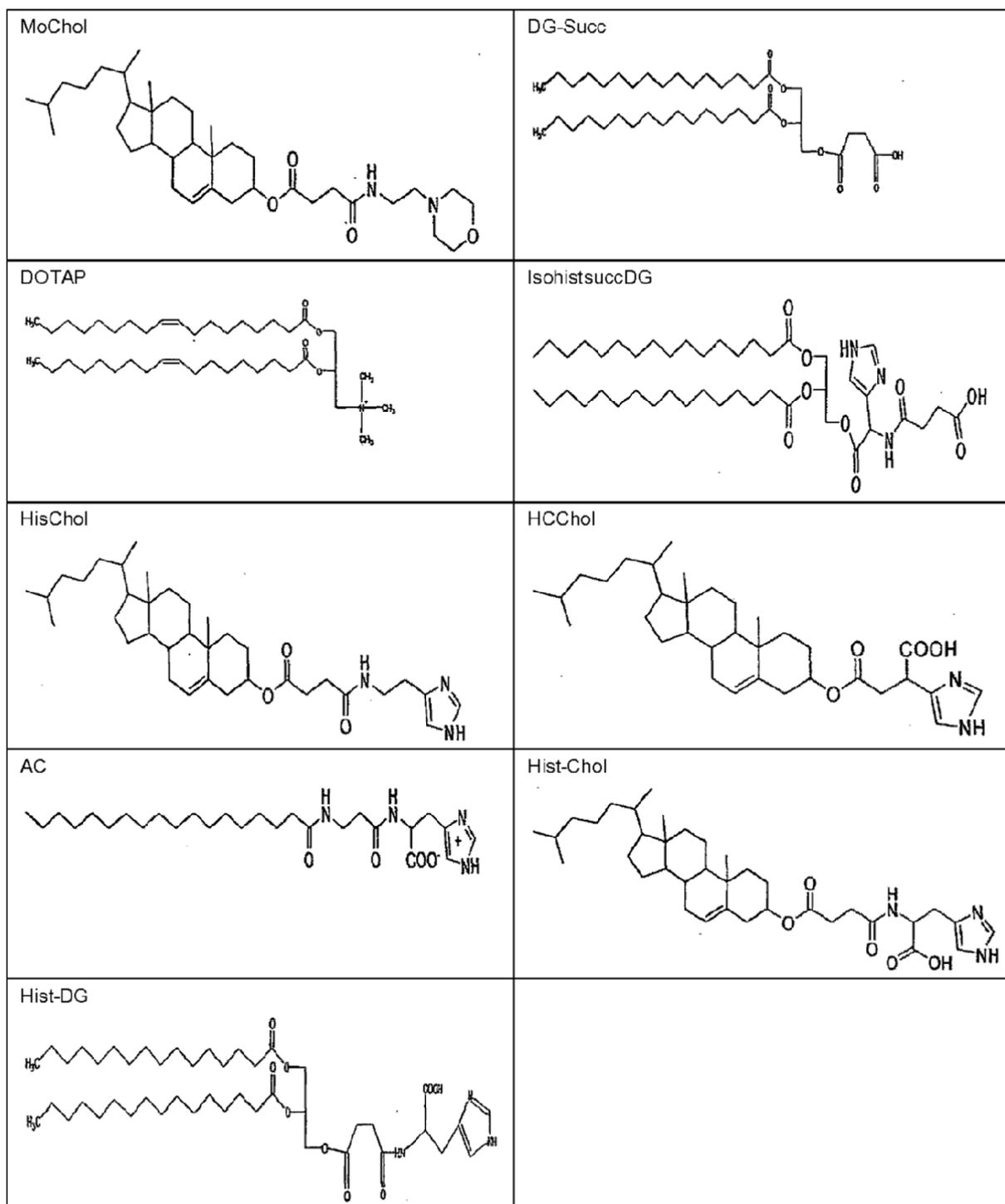
Las abreviaturas para los lípidos se refieren, principalmente, a su uso convencional en la bibliografía y se incluyen aquí como una referencia útil:

DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
30 DPPC	Dipalmitoilfosfatidilcolina
DSPC	Diesteoilfosfatidilcolina
POPC	Palmitoil-oleoilfosfatidilcolina
OPPC	1-oleoil-2-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
DOPC	Dioleoilfosfatidilcolina
35 DOPE	Dioleoilfosfatidiletanolamina
DMPE	Dimiristoilfosfatidiletanolamina
DPPE	Dipalmitoilfosfatidiletanolamina
DOPG	Dioleoilfosfatidilglicerol
POPG	Palmitoil-oleoilfosfatidilglicerol
40 DMPG	Dimiristoilfosfatidilglicerol
DPPG	Dipalmitoilfosfatidilglicerol
DLPG	Dilaurilfosfatidilglicerol
DSPG	Diestraroilfosfatidilglicerol
DMPS	Dimiristoilfosfatidilserina
45 DPPS	Dipalmitoilfosfatidilserina
DOPS	Dioleoilfosfatidilserina
POPS	Palmitoil-oleoilfosfatidilserina
DMPA	Ácido dimiristoilfosfatídico
DPPA	Ácido dipalmitoilfosfatídico
50 DOPA	Ácido dioleoilfosfatídico
POPA	Ácido palmitoil-oleoilfosfatídico
DSPA	Ácido diesteoilfosfatídico
DLPA	Ácido dilaurilfosfatídico
CHEMS	Colesterolhemisuccinato
55 DC-Col	3-β-[N-(N',N'-dimetiletano) carbamoil]colesterol
Cet-P	Cetilfosfato
DODAP	Cloruro de (1,2)-dioleoiloxipropil)-N,N-dimetilamonio
DOEPC	1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina
DAC-Col	3-β-[N-(N',N'-dimetiletano) carbamoil]colesterol
60 TC-Col	3-β-[N-(N',N',N'-trimetilaminoetano) carbamoil]colesterol
DOTMA	Cloruro de (1,2-dioleiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio (Lipofectin®)

ES 2 419 106 T3

	DOGS	((C 18)2GlySper3+) N,N-dioctadecilamido-glicil-espermina (Transfectam®)
	CTAB	Bromuro de cetil-trimetilamonio
	CPyC	Cloruro de cetil-piridinio
	DOTAP	Sal (1,2-dioleoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio
5	DMTAP	Sal (1,2-dimiristoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio
	DPTAP	Sal (1,2-dipalmitoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio
	DOTMA	Cloruro de (1,2-dioleoiloxipropil)-N,N,N-trimetilamonio)
	DORIE	Bromuro de (1,2-dioleoiloxipropil)-3 dimetilhidroxietil amonio)
	DDAB	Bromuro de dimetildioctadecilamonio
10	DPIM	4-(2,3-bis-palmitoiloxi-propil)-1-metil-1H-imidazol
	CHIM	Histaminil-Colesterolcarbamato
	MoCol	4-(2-Aminoetil)-Morfolino-Colesterolhemisuccinato
	HisCol	Histaminil-Colesterolhemisuccinato
	HCCol	N α -Histidinil-Colesterolcarbamato
15	HistCol	N α -Histidinil-Colesterol-hemisuccinato
	AC	Acilcarnosina, estearil- y palmitoilcarnosina
	HistDG	1,2-Dipalmitoilglicerol-hemisuccinat-N_-Histidinil-hemisuccinato, y derivados Diestearoil-Dimiristoil, Dioleoil o palmitoil-oleoil
20	IsoHistSuccDG	1,2-ipalmitoilglicerol-O_-Histidinil-N α -hemisuccinato, y derivados Diestearoil-, Dimiristoil, Dioleoil o palmitoil-oleoil
	DGSucc	1,2-Dipalmitoilglicerol-3-hemisuccinato y derivados Diestearoil-, dimiristoil-, Dioleoil o palmitoil-oleoil
	EDTA-Col	colesterol éster de ácido etilenediaminatetracético
	Hist-PS	N α -histidinil-fosfatidilserina
25	BGSC	bisguanidinio-espermidin-colesterol
	BGTC	bisguanidinio-tren-colesterol
	DOSPER	(1,3-dioleoiloxi-2-(6-carboxi-espermil)-propilamida
	DOSC	(1,2-dioleoil-3-succinil-sn-gliceril colina éster)
	DOGSDO	(1,2-dioleoil-sn-glicero-3-succinil-2-hidroxietil disulfuro ornitina)
30	DOGSucc	1,2-Dioleoilglicerol-3-hemisuccinato
	POGSucc	Palmitoil-oleoilglicerol-oleoil-3-hemisuccinato
	DMGSucc	1,2-Dimiristoilglicerol-3-hemisuccinato
	DPGSucc	1,2-Dipalmitoilglicerol-3-hemisuccinato

35 La siguiente tabla proporciona ejemplos no limitantes de lípidos que son adecuados para su uso en las composiciones de acuerdo con la presente invención. Los anclajes de membrana de los lípidos se muestran de forma ejemplar y sirve solamente para ilustrar los lípidos de la invención y no se pretende que los limiten.



V. Sistema de suministro liposomal anfótero

Los liposomas anfóteros representan una clase recientemente descrita de liposomas que tiene carga aniónica o neutra a aproximadamente pH 7,5 y carga catiónica a pH 4. Las Publicaciones Internacionales de PCT Número WO 02/066490, WO 02/066120 y WO 03/070220, cada una de las cuales se incorpora por referencia, dan una descripción detallada de liposomas anfóteros y lípidos adecuados para los mismos. El uso de liposomas anfóteros como vehículos de oligonucleótidos de ADNi de acuerdo con la presente invención para tratar cáncer en células y en mamíferos, tal como inhibiendo y/o reduciendo el crecimiento tumoral, requiere que los liposomas sean estables en el torrente sanguíneo y en tejidos. Particularmente, después de una aplicación sistémica, los oligonucleótidos de ADNi deben secuestrarse de forma estable en los liposomas hasta la captación eventual en los tejidos o células diana. En consecuencia, las directrices para formulaciones liposomales de la FDA regulan ensayos preclínicos

específicos para fármacos liposomales (<http://www.fda.gov/cder/guidance/2191dft.pdf>). Por ejemplo, la relación de fármaco encapsulado y fármaco libre debe determinarse durante el tiempo en circulación en el torrente sanguíneo.

Después de la inyección de liposomas en el torrente sanguíneo, los componentes del suero interactúan con los liposomas y pueden conducir a permeabilización de los liposomas. Sin embargo, la liberación de un fármaco o molécula que esté encapsulado en un liposoma depende de las dimensiones moleculares del fármaco o molécula. En consecuencia, se libera un plásmido de miles de pares de bases mucho más lentamente que oligonucleótidos más pequeños u otras moléculas pequeñas. Para suministro liposomal de fármacos o moléculas, es esencial que la liberación del fármaco durante la circulación de los liposomas en el torrente sanguíneo sea tan baja como sea posible.

Los liposomas anfóteros de la mezcla de acuerdo con la presente invención, incluyen uno o más lípidos anfóteros o como alternativa una mezcla de componentes lipídicos aniónicos y catiónicos con propiedades anfóteras. Los lípidos anfóteros adecuados se desvelan en la Publicación Internacional de PCT Número WO02/066489 así como en la Publicación Internacional de PCT Número WO03/070735, los contenidos de ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Como alternativa, la fase lipídica puede formularse usando componentes aniónicos y/o catiónicos sensibles a pH, como se desvela en la Publicación Internacional de PCT Número WO02/066012, los contenidos de la cual se incorporan por referencia en el presente documento. Se desvelan lípidos catiónicos sensibles a pH en las Publicaciones Internacionales de PCT Número WO02/066490 y WO03/070220, en Budker, y col. 1996, Nat. Biotechnol. 14(6): 760-4, y en la Patente de Estados Unidos Número 6.258.792, los contenidos de las cuales se incorporan por referencia en el presente documento, y pueden usarse en combinación con lípidos aniónicos cargados constitutivamente o con lípidos aniónicos que son sensibles a pH. Por el contrario, la carga catiónica también puede introducirse de lípidos cargados constitutivamente que se conocen por los expertos en la materia en combinación con un lípido aniónico sensible a pH (véase también Publicaciones Internacionales de PCT Número WO05/094783, WO03/070735, WO04/100928, WO06/48329, WO06/053646 y solicitudes de Patente de Estados Unidos 2003/0099697, 2005/0164963, 2004/0120997, 2006/002991, 2006/159737, 2006/0216343, cada una de las cuales también se incorpora en su totalidad por referencia).

Las mezclas de la presente invención incluyen 1) lípidos anfóteros o una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras; 2) lípidos neutros; y 3) uno o más oligonucleótidos de ADN como se han definido anteriormente.

A. Lípidos usados en liposomas anfóteros

1. Lípidos anfóteros

Se desvelan lípidos anfóteros en las Publicaciones Internacionales de PCT Número WO02/066489 y WO03/070735, los contenidos de ambas de las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. La molécula global asume sus características de carga dependiente de pH por la presencia simultánea de grupos catiónicos y aniónicos en la parte de molécula de "sustancia anfótera". Más específicamente, una sustancia anfótera se caracteriza por el hecho de que la suma de sus componentes de carga será precisamente cero a un valor de pH particular. Este punto se denomina punto isoeléctrico (PI). Por encima del PI, el compuesto tiene una carga negativa, y por debajo del PI debe considerarse un catión positivo, variando el PI de los lípidos anfóteros entre 4,5 y 8,5.

La carga global de la molécula a un valor de pH particular del medio puede calcularse como sigue:

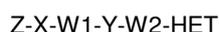
$$z = \sum ni \times ((qi - 1) + (10^{(pK - pH)}) / (1 + 10^{(pK - pH)}))$$

qi: carga absoluta del grupo iónico por debajo de la pK del mismo (por ejemplo carboxilo = 0, base nitrogenada individual = 1, grupo fosfato diesterificado = -1)
ni: número de dichos grupos en la molécula.

Por ejemplo, un compuesto se forma acoplado el grupo amino de histidina con colesterol hemisuccinato. A un valor de pH neutro de 7, el producto tiene una carga negativa porque la función carboxilo que está presente en el mismo está en su forma completamente disociada, y la función de imidazol solamente tiene una carga baja. A un valor de pH ácido de aproximadamente 4, la situación se invierte: la función carboxilo ahora está en su mayoría descargada, mientras que el grupo imidazol está esencialmente completamente protonado, y la carga global de la molécula es por lo tanto positiva.

En una realización, el lípido anfótero está seleccionado entre el grupo que consiste en HistCol, HistDG, isoHistSuc-cDG, Acilcarosina y HCCol. En otra realización, el lípido anfótero es HistCol.

Los lípidos anfóteros pueden incluir, sin limitación, derivados de lípidos catiónico que incluyen un sustituyente aniónico. Los lípidos anfóteros incluyen, sin limitación, los compuestos que tienen la estructura de fórmula:



en la que:

Z es un esteroil o un alifático;

El esteroil está seleccionado entre el grupo que consiste en colesterol, sitosterol, campesterol, desmosterol, fucosterol, 22-ketosterol, 20-hidroxisterol, sigmasterol, 22-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, lanosterol, 7-deshidrocolesterilo, dihidrocolesterol, 19-hidroxicolesterol, 5 α colest-7-en-3 β -ol, 7-hidroxicolesterol, epicolesterol, ergosterol deshidroergosterol, y derivados de los mismo;

Cada W1 es independientemente un alifático no sustituido;

Cada W2 es independientemente un alifático opcionalmente sustituido con HO(O)C-alifáticoamino o carboxi;

Cada X e Y está independientemente ausente, o es -(C=O)-O-, -(C=O)-NH-, -(C=O)-S-, -O-, -NH-, -S-, -CH=N-, -O-(O=C)-, -S-(O=C)-, -NH-(O=C)-, y -N=CH-; y

HET es un amino, un heterocicloalifático opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

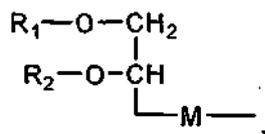
En algunos aspectos, el HET es un heterocicloalifático opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo, o un heteroarilo opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo. En otros aspectos, el HET es morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirimidinilo, o piridinilo. En otro aspecto, el lípido catiónico tiene la estructura Esteroil-X-espaciador1-Y-espaciador2-morfolinilo o Esteroil-X-espaciador1-Y-espaciador2-imidazolilo. En otros aspectos adicionales, el esteroil es colesterol.

En otras realizaciones, los lípidos anfóteros incluyen, sin limitación, los compuestos que tienen la estructura de fórmula:



en la que:

Z es una estructura de acuerdo con la fórmula general



en la que R1 y R2 son independientemente cadenas de alquilo o acilo C8-C30 con 0, 1 o 2 enlaces etilénicamente insaturados y M está seleccionado entre el grupo que consiste en -O-(C=O)-; -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH- y/o -S-S-;

el esteroil está seleccionado entre el grupo que consiste en colesterol, sitosterol, campesterol, desmosterol, fucosterol, 22-ketosterol, 20-hidroxisterol, sigmasterol, 22-hidroxicolesterol, 25 hidroxicolesterol, lanosterol, 7-deshidrocolesterilo, dihidrocolesterol, 19-hidroxicolesterol, 5 α colest-7-en-3 β -ol, 7-hidroxicolesterol, epicolesterol, ergosterol deshidroergosterol, y derivados de los mismos;

Cada W1 es independientemente un alifático no sustituido con hasta 8 átomos de carbono;

Cada W2 es independientemente un alifático, ácido carboxílico con hasta 8 átomos de carbono y 0, 1 o 2 enlaces etilénicamente insaturados;

X está ausente e Y es -(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; NH-(C=O)-O-; -O-; -NH-; -CH=N-; -O-(O=C)-; -S-; -(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH-; -N=CH- y/o -S-S-; y

HET es un amino, un heterocicloalifático opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos, el HET es un heterocicloalifático opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo, o un heteroarilo opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo. En otros aspectos, el HET es morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirimidinilo, o piridinilo. En otro aspecto, el lípido catiónico tiene la estructura Esteroil-X-espaciador1-Y-espaciador2-morfolinilo o Esteroil-X-espaciador1-Y-espaciador2-imidazolilo. En otros aspectos adicionales, el esteroil es colesterol.

2. Mezclas de Componentes Lipídicos con Propiedades Anfóteras

Como alternativa, la fase lipídica puede formularse usando componentes aniónicos y/o catiónicos sensibles al pH, como se desvela en la Publicación Internacional PCT Número WO02/066012, cuyos contenidos se incorporan por referencia en el presente documento. Los lípidos catiónicos sensibles al pH se desvelan en las Publicaciones Internacionales PCT Números WO02/066490 y WO03/070220, en Budker, y col. (1996), Nat Biotechnol. 14(6):760-4, y en la Patente de Estados Unidos Número 6.258.792, incorporándose los contenidos de todos ellos por referencia en el presente documento. Como alternativa, la carga catiónica puede introducirse a partir de lípidos cargados constitutivamente conocidos por los expertos en la materia en combinación con un lípido aniónico sensible al pH. Las combinaciones de lípidos aniónicos y catiónicos cargados constitutivamente (por ejemplo, carga estable en un intervalo específico de pH tal como un pH entre aproximadamente 4 y 9), por ejemplo DOTAP y DPPG no son preferidas. Por tanto, en algunas realizaciones, la mezcla de componentes lipídicos puede comprender (i) un lípido catiónico estable y un lípido aniónico cargable, (ii) un lípido catiónico cargable y un lípido aniónico cargable o (iii) un lípido aniónico estable y un lípido catiónico cargable.

Los grupos cargados pueden dividirse en los siguientes 4 grupos.

- (1) Fuertemente catiónico (por ejemplo, cargado constitutivamente), $pK_a > 9$, carga neta positiva: en base a su naturaleza química, estos son, por ejemplo, grupos amonio, amidinio, guanidío o piridinio o funciones amino primaria, secundaria o terciaria.
- 5 (2) Débilmente catiónico, $pK_a < 9$, carga neta positiva: en base a su naturaleza química, estos son, en particular, bases de nitrógeno tales como piperazinas, imidazoles y morfolinas, purinas o pirimidinas. Tales fragmentos moleculares, que ocurren en sistemas biológicos, son, por ejemplo, 4-imidazoles (histamina), 2-, 6-, o 9-purinas (adeninas, guaninas, adenosinas o guanosinas), 1-, 2- o 4-pirimidinas (uracilos, timinas, citosinas, uridinas, timidinas, citidinas) o también ácidos piridina-3-carboxílicos (ésteres nicotínicos o amidas).
- 10 Las bases de nitrógeno con valores de pK_a preferidos se forman también sustituyendo los átomos de nitrógeno una o más veces con alcano hidroxilos de bajo peso molecular, tales como grupos hidroximetilo o hidroxietilo. Por ejemplo, aminodihidroxiopropanos, trietanolaminas, tris-(hidroximetil)metilaminas, bis-(hidroximetil)metilaminas, tris-(hidroxietil)metilaminas, bis-(hidroxietil)metilaminas o las etilaminas sustituidas correspondiente.
- 15 (3) Débilmente aniónico, $pK_a > 4$, carga neta negativa: en base a su naturaleza química, estos son, en particular, los ácidos carboxílicos. Estos incluyen los ácidos mono-, di- o tri-carboxílicos alifáticos, lineales o ramificados con hasta 12 átomos de carbono y 0, 1 o 2 enlaces etilénicamente insaturados. Los ácidos carboxílicos de comportamiento adecuado se encuentran también como sustitutos de aromático sistemas. Otros grupos débilmente aniónicos son hidroxilos o tioles, que pueden disociarse y encontrarse en ácido ascórbico, aloxano N-sustituido, ácido barbitúrico N-sustituido, veronal, fenol o como un grupo tiol.
- 20 (4) Fuertemente aniónico (por ejemplo, cargado constitutivamente), $pK_a < 4$, carga neta negativa: en base a su naturaleza química, estos son grupos funcionales tales como ésteres de sulfonato o fosfato.

Los liposomas anfóteros contienen cantidades variables de tales materiales anfífilos formadores de membrana o basados en membrana, de manera que tiene un carácter anfótero. Esto significa que los liposomas pueden cambiar el signo de la carga completamente. La cantidad de soporte de carga de un liposoma, presente a un pH dado del medio, puede calcularse usando la siguiente fórmula:

$$z = \sum n_i ((q_i - 1) + 10^{(pK - pH)}) / (1 + 10^{(pK - pH)})$$

en la que

- 30 q_i es la carga absoluta de los grupos iónicos individuales por debajo de su pK (por ejemplo, carboxilo = 0, base de nitrógeno simple = 1, grupo fosfato de la segunda etapa de disociación = -1, etc.)
 n_i es el número de estos grupos en el liposoma.

En el punto isoeléctrico, la carga neta del liposoma es 0. Las estructuras con un punto isoeléctrico seleccionable en gran medida pueden producirse mezclando porciones aniónicas y catiónicas.

- 35 En una realización, los componentes catiónicos incluyen DPIM, CHIM, DORIE, DDAB, DAC-Col, TC-Col, DOTMA, DOGS, $(C_{18})_2Gly^+$ N,N-dioctadecilamido-glicina, CTAB, CPyC, DODAP DMTAP, DPTAP, DOTAP, DC-Col, MoCol, HisCol y DOEPC. En otra realización, los lípidos catiónico incluyen DMTAP, DPTAP, DOTAP, DC-Col, MoCol y HisCol.

Los lípidos catiónico sensibles al pH se desvelan en las Publicaciones Internacionales PCT Número WO 02/066490 así como WO 03/070220, incorporándose los contenidos de ambas en el presente documento por referencia.

- 40 Los lípidos catiónico sensibles al pH pueden ser compuestos que tienen la estructura de fórmula



en la que:

L es un esteroil o [alifático(C(O)O)-]₂alquilo-;

- 45 El esteroil está seleccionado entre el grupo que consiste en colesterol, sitosterol, campesterol, desmosterol, fucosterol, 22-ketosterol, 20-hidroxisterol, sigmasterol, 22-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, lanosterol, 7-deshidrocolesterilo, dihidrocolesterol, 19-hidroxicolesterol, 5 α colest-7-en-3 β -ol, 7-hidroxicolesterol, epicolesterol, ergosterol deshidroergosterol, y derivados de los mismos;

Cada espaciador 1 y espaciador 2 es independientemente un alifático no sustituido;

- 50 Cada X e Y está independientemente ausente, o es -(C=O)-O-, -(C=O)-NH-, -(C=O)-S-, -O-, -NH-, -S-, -CH=N-, -O-(O=C)-, -S-(O=C)-, -NH-(O=C)-, =CH-, -CH₂-, =N-O-, =N-NH-, =N-NH-(C=O)-, NH-SO₂-, S(O)_n-, S(O)₂-NH-o -N=CH-; y

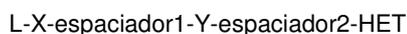
HET es un amino, un heterocicloalifático opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

En algunos aspectos, el HET es un heterocicloalifático opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo, o un heteroarilo opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el

anillo. En otros aspectos, el HET es morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirimidinilo o piridinilo. En otro aspecto, el lípido catiónico has la estructura Esterol-X-espaciador1-Y-espaciador2-morfolinilo o Esterol-X-espaciador1-Y-espaciador2-imidazolilo. En otros aspectos adicionales, el esterol es colesterol.

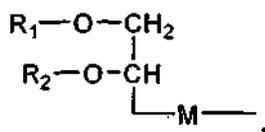
5 En una realización, X es -O-, Espaciador 1 y Espaciador 2 son (CH₂)₂, Y es -(C=O)-NH-, y HET es morfolinilo. En otra realización, X es =CH-, Espaciador 1 y Espaciador 2 son (CH₂)₂, Y es -(C=O)-NH-, y HET es morfolinilo. En otra realización más, X es -CH₂-, Espaciador 1 y Espaciador 2 son (CH₂)₂, Y es -(C=O)-NH-, y HET es morfolinilo. En aún otra realización, X es =N-O-, Espaciador 1 es -CH₂-, Y es -(C=O)-NH-, Espaciador 2 es (CH₂)₂ HET es morfolinilo. En aún otra realización más, X es =N-NH-, Espaciador 1 es -CH₂-, Y es -(C=O)-NH-, Espaciador 2 es (CH₂)₂ y HET es morfolinilo. En una realización adicional, X es =N-NH-(C=O)-, Espaciador 1 es -CH₂-, Y es -(C=O)-NH-, Espaciador 2 es (CH₂)₂ y HET es morfolinilo. En una realización adicional más, X es -NH-(C=O)-, Espaciador 1 es -CH₂-, Y es -(C=O)-NH-, Espaciador 2 es (CH₂)₂ y HET es morfolinilo. En aún una realización adicional más, X es -NH-, Espaciador 1 y Espaciador 2 son (CH₂)₂, Y es -(C=O)-NH-, y HET es morfolinilo. En otra realización, X es -NH-(SO₂)_n-, Espaciador 1 es -CH₂-, Y es -(C=O)-NH-, Espaciador 2 es (CH₂)₂ y HET es morfolinilo, en la que n es 1 o 2. En otra realización más, X es -S(O₂)-NH-, Espaciador 1 es -CH₂-, Y es -(C=O)-NH-, Espaciador 2 es (CH₂)₂ y HET es morfolinilo. Los compuestos anteriores pueden sintetizarse usando síntesis de 1 o más etapas, y pueden prepararlos los expertos en la materia.

En otra realización, los lípidos catiónicos sensibles al pH pueden ser compuestos que tienen la estructura de fórmula



en la que:

20 L es una estructura de acuerdo con la fórmula general



en la que R1 y R2 son independientemente cadenas de alquilo o acilo C8-C30 con 0, 1 o 2 enlaces etilénicamente insaturados y M está ausente, o es -O-(C=O)-; -NH-(C=O)-; -S-(C=O)-; -O-; -NH-; -S-; -N=CH-; -(O=C)-O-; -S-(O=C)-; -NH-(O=C)-; -N=CH- y/o -S-S-;

25 El esterol está seleccionado entre el grupo que consiste en colesterol, sitosterol, campesterol, desmosterol, fucosterol, 22-ketosterol, 20-hidroxisterol, sigmasterol, 22-hidroxicolesterol, 25 hidroxicolesterol, lanosterol, 7-deshidrocolesterol, dihidrocolesterol, 19-hidroxicolesterol, 5 α colest-7-en-3 β -ol, 7-hidroxicolesterol, epicolesterol, ergosterol deshidroergosterol, y derivados de los mismos;

30 Cada espaciador 1 y espaciador 2 es independientemente un alifático no sustituido con 1-8 átomos de carbono; X está ausente e Y está ausente o es -(C=O)-O-; -(C=O)-NH-; -NH-(C=O)-O-; -O-; -NH-; -CH=N-; -O-(O=C)-; -S-; -(O=C)-; -NH-(O=C)-; -O-(O=C)-NH-, -N=CH- y/o -S-S-; y

HET es un amino, un heterocicloalifático opcionalmente sustituido o un heteroarilo opcionalmente sustituido.

35 En algunos aspectos, el HET es un heterocicloalifático opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo, o un heteroarilo opcionalmente sustituido incluyendo al menos un átomo de nitrógeno en el anillo. En otros aspectos, el HET es morfolinilo, piperidinilo, piperazinilo, pirimidinilo o piridinilo. En otro aspecto, el lípido catiónico tiene la estructura Esterol-X-espaciador1-Y-espaciador2-morfolinilo o Esterol-X-espaciador1-Y-espaciador2-imidazolilo. En otros aspectos adicionales, el esterol es colesterol.

40 Las mezclas anfóteras comprenden adicionalmente lípidos aniónicos, cargados constitutiva o condicionalmente en respuesta al pH, y tales lípidos son conocidos también por los expertos en la materia. En una realización, los lípidos para su uso con la invención incluyen DOGSucc, POGSucc, DMGSucc, DPGSucc, DMPS, DPPS, DOPS, POPS, DMPG, DPPG, DOPG, POPG, DMPA, DPPA, DOPA, POPA, CHEMS, CetilIP, DGSucc, y combinaciones de los mismos.

3. Lípidos neutros

45 Los lípidos neutros incluyen cualquier lípido que siga teniendo carga neutra a un pH entre aproximadamente 4 y 9. Los lípidos neutros incluyen, sin limitación, colesterol, otros esteroides y derivados de los mismos, fosfolípidos y combinaciones de los mismos y otros lípidos neutros. Los fosfolípidos incluyen un fosfolípido cualquiera o combinación de fosfolípidos capaces de formar liposomas. Incluyen fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, lecitina y fracciones de los mismos, ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol, fosfatidilserinas, plasmalógenos y esfingomielinas. Las fosfatidilcolinas incluyen, sin limitación, las obtenidas de huevo, soja u otras fuentes vegetales o las que son parcial o completamente sintéticas o de longitud e instauración de cadena lipídica variable, POPC, OPPC, PC de soja natural o hidrogenada, PC de huevo natural o hidrogenada, DMPC, DPPC, DSPC, DOPC y derivados de los mismos. En una realización, las fosfatidilcolinas son POPC, PC de soja no hidrogenada y PC de huevo no hidrogenada. Las fosfatidiletanolaminas incluyen, sin limitación, DOPE, DMPE y DPPE y derivados de las

mismas. Los fosfatidilgliceroles incluyen, sin limitación, DMPG, DLPG, DPPG y DSPG. Los ácidos fosfatídicos incluyen, sin limitación, DSPA, DMPA, DLPA y DPPA.

Los esteroides incluyen derivados de colesterol tales como 3-hidroxi-5,6-colesteno y análogos relacionados, tales como 3-amino-5,6-colesteno y 5,6-colesteno, colestano, colestanol y análogos relacionados, tales como 3-hidroxi-colestano; y derivados de colesterol cargados tales como colesteryl-beta-alanina y colesterol hemisuccinato.

Otros lípidos neutros incluyen α -tocoferoles y derivados, tales como α -tocoferol acetato.

En otra realización los lípidos neutros incluyen sin limitación, DOPE, POPC, PC de soja o PC de huevo y colesterol.

B. Oligonucleótidos de ADNi

1. Regiones reguladoras del gen *bcl-2*

El gen *bcl-2* tiene dos promotores designados P1 y P2. P1 del que se transcribe la mayoría del ARNm de *bcl-2* está localizado aproximadamente 1,4 kb cadena arriba del sitio de inicio de la traducción y P2 está 1,3 kb cadena abajo de P1. (Véase Seto, M. y col. EMBO J. 7, 123-131 (1988). P1 es rico en GC, carece de una caja TATA, tiene muchos sitios de inicio de la transcripción e incluye siete sitios de unión consenso para el factor de transcripción de SP1. P2 incluye una caja CCAAT y una caja TATA y tiene dos sitios de inicio de la transcripción diferentes. Hay múltiples sitios de reconocimiento de NF- κ B y un motivo octamérico de tipo potenciador de SV40 dentro de P2. (Véase Heckman, C.A., y col. Oncogene 21, 3898-3908 (2002)) (Véase SEC ID N°: 1254). La mayoría de los linfomas foliculares humanos contienen translocaciones cromosómicas t(14;18) que resultan de puntos de rotura de región del gen *bcl-2* 3' (Véase Tsujimoto, Y. y col. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 84, 1329-1331 (1987).) Estas translocaciones sitúan la expresión de *bcl-2* bajo el control del potenciador de locus de cadena pesada de inmunoglobulina (IgH) dando como resultado la regulación positiva de la expresión de *bcl-2*. Como alternativa, hay regiones de rotura de *bcl-2* 5' que resultan de fusiones con el locus IgH o dos loci de cadena ligera de inmunoglobulina (IgL) diferentes que se encuentran en algunos aislados de pacientes con linfoma DLCL. (Véase Yonetani, N. y col. Jpn. J. Cancer Res. 92, 933-940 (2001)) Estos puntos de rotura de *bcl-2* 5' se han mapeado en aislados de pacientes heterogéneos separados en una región que abarca de 378 a 2312 pb cadena arriba del sitio de inicio de la traducción (Véase SEC ID N°: 1255-1266). Las regiones en torno a los puntos de rotura pueden ser secuencias que pueden usarse para criterios de diseño preferidos para diseño de oligonucleótidos de ADNi de *bcl-2*.

2. Diseño de oligonucleótidos de ADNi

Los oligonucleótidos de ADNi, en algunas realizaciones, son oligómeros de ADN que son complementarios a la cadena más o cadena menos del ADN bicatenario. El oligonucleótido de ADNi puede hibridar con regiones reguladoras del gen *bcl-2*. Para los fines de la presente invención, esas regiones cadena arriba se definen N°: 1249 (para *bcl-2*), siempre que el oligonucleótido de ADNi sea un oligonucleótido de ácido nucleico monocatenario o derivado del mismo, cuya secuencia es complementaria, en parte, de una parte de la región no transcrita más larga de un gen en el que el oligonucleótido afecta indirecta o directamente a la expresión, regulación o producción del mismo o diferente gen, en la que la región no transcrita más larga incluye cualquier parte del gen que no se transcriba cuando el sitio de inicio de la transcripción sea el sitio más cercano al sitio de inicio de la traducción. Los oligonucleótidos de ADNi no incluyen ARNi y oligonucleótidos antisentido que forman pares de bases solamente con ARNm o pre ARNm e interfieren con el procesamiento de ARN y/o la traducción del mensaje.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi pueden diseñarse basándose en ciertos criterios de diseño. Dichos oligonucleótidos de ADNi pueden después ensayarse con respecto a eficacia usando los procedimientos desvelados en el presente documento. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi están metilados en al menos una, dos o todas las islas de CpG. En otras realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi no contienen metilación. La presente invención no está limitada a un mecanismo particular. De hecho, no es necesario un entendimiento del mecanismo para practicar la presente invención. No obstante, se contempla que los oligonucleótidos de ADNi en algunas realizaciones son los que tienen al menos un contenido de GC del 50 % y al menos dos dinucleótidos GC. Además, en algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi no autohibridan. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos de ADNi se diseñan con al menos 1 A o T para minimizar la autohibridación. En más realizaciones adicionales, se usan programas informáticos disponibles en el mercado para explorar los oligonucleótidos de ADNi con respecto a la capacidad para autohibridar. En otras realizaciones más, los oligonucleótidos de ADNi son de al menos 10 o 15 nucleótidos y no más de 100 nucleótidos de longitud. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos de ADNi son de 18-26 nucleótidos de longitud. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi comprenden las secuencias de unión a proteína universal CGCCC y CGCG o los complementos de las mismas.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi hibridan con una región reguladora de un gen cadena arriba de la caja TATA del promotor. En realizaciones adicionales, los oligonucleótidos de ADNi se diseñan para hibridar con regiones reguladoras de un oncogén que se sabe que se une a proteínas (por ejemplo, factores de transcripción). En algunas realizaciones, los compuestos oligonucleotídicos de ADNi no son completamente homólogos de otras regiones del genoma humano. La homología de los nucleótidos de ADNi con otras regiones del genoma puede determinarse usando herramientas de búsqueda disponibles (por ejemplo, BLAST disponible en el

sitio de Internet de NCBI).

La presente invención no se limita a las secuencias oligonucleotídicas de ADNi específicas descritas en el presente documento. Pueden identificarse otros oligonucleótidos de ADNi adecuados (por ejemplo, usando los criterios descritos anteriormente u otros criterios). Pueden ensayarse oligonucleótidos de ADNi candidatos con respecto a eficacia usando cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, los oligonucleótidos de ADNi candidatos pueden evaluarse con respecto a su capacidad para evitar la proliferación celular en una diversidad de concentraciones. En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi inhiben la expresión génica o la proliferación celular a una concentración baja (por ejemplo, menos de 20 μM o 10 μM en ensayos *in vitro*).

3. Zonas de oligonucleótidos de ADNi

En algunas realizaciones, las regiones dentro de las regiones reguladoras de los oncogenes se definen adicionalmente como regiones para hibridación de oligonucleótidos de ADNi. En algunas realizaciones, estas regiones se denominan "zonas calientes".

En algunas realizaciones, las zonas calientes se definen basándose en compuestos oligonucleotídicos de ADNi que se ha demostrado que son eficaces (véase sección anterior sobre oligonucleótidos de ADNi) y las que se ha contemplado que son eficaces basándose en los criterios para oligonucleótidos de ADNi descritos anteriormente. En realizaciones adicionales, las zonas calientes abarcan 10 pb cadena arriba y cadena abajo de cada compuesto incluidos en cada zona caliente y tiene al menos un CG o más dentro de un incremento de 40 pb más cadena arriba o cadena abajo de cada compuesto. En más realizaciones adicionales, las zonas calientes abarcan un máximo de 100 pb cadena arriba y cadena abajo de cada compuesto oligonucleotídico incluido en la zona caliente. En realizaciones adicionales, las zonas calientes se definen en regiones de partida de cada promotor. Estas zonas calientes se definen basándose en secuencia o secuencias eficaces o secuencias contempladas y tienen una longitud máxima preferida de 200 pb. Basándose en los criterios descritos anteriormente, se diseñaron zonas calientes ejemplares. Estas zonas calientes se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1	
Ejemplos de Zonas Calientes	
Gen	Zonas Calientes
Bcl-2	679-720, 930-1050, 1070-1280, 1420-1760

4. Oligómero de ADNi

Los ejemplos de oligómeros de ADNi incluyen los oligómeros de ADNi enumerados en SEC ID N° 1250 y 1251 y los complementos de los mismos. En otras realizaciones, los oligómeros de ADNi pueden ser SEC ID N° 1250, 1251 o el complemento de las mismas, en los que la mezcla de oligómeros de ADNi comprende oligómeros de ADNi de al menos 2 secuencias diferentes.

En algunas realizaciones, la presente invención proporciona compuestos terapéuticos de oligonucleótidos de ADNi que están metilados en sitios específicos. La presente invención no se limita a un mecanismo particular. De hecho, no es necesario un entendimiento del mecanismo para la práctica de la presente invención. No obstante, se contempla que un mecanismo para la regulación de la activación génica es la metilación de restos de citosinas en ADN. 5-metilcitosina (5-MeC) es la única base modificada de origen natural detectada en ADN (Ehrlick y col., *Science* 212: 1350-1357 (1981)). Aunque no todos los genes se regulan por metilación, la hipometilación en sitios específicos o en regiones específicas en varios genes se correlaciona con transcripción activa (Doerfler, *Ann. Rev. Biochem.* 52: 93-124 [1984]; Christman, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 108: 49-78 [1988]; Cedar, *Cell* 34: 5503-5513 [1988]). La metilación de ADN *in vitro* puede evitar la transcripción eficaz de genes en un sistema sin células o expresión transitoria de genes transfectados. La metilación de restos de C en algunas regiones reguladoras en cis específicas también puede bloquear o potenciar la unión de factores de transcripción o represores (Doerfler, mencionado anteriormente; Christman, mencionado anteriormente; Cedar, *Cell* 34: 5503-5513 (1988); Tate y col., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3: 225-231 [1993]; Christman y col., *Virus Strategies*, eds. Doerfler, W. y Bohm, P. (VCH, Weinheim, N.Y.) pág. 319-333 [1993]).

La alteración de los patrones normales de metilación de ADN se ha ligado al desarrollo de cáncer (Christman y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7347-7351 [1995]). El contenido de 5-MeC de ADN de tumores y líneas celulares derivadas de tumores es generalmente más bajo que el de los tejidos normales (Jones y col., *Adv. Cancer Res* 40: 1-30 [1983]). La hipometilación de oncogenes específicos tales como c-myc, c-Ki-ras y c-Ha-ras se ha detectado en una diversidad de tumores humanos y animales (Nambu y col., *Jpn. J. Cancer (Gann)* 78: 696-704 [1987]; Feinberg y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 47-54 [1983]; Cheah y col., *JNCI* 73: 1057-1063 [1984]; Bhave y col., *Carcinogenesis (Lond)* 9: 343-348 [1988]). En uno de los ejemplos mejor estudiados de progresión tumoral humana, se ha mostrado que la hipometilación de ADN es un acontecimiento temprano en el desarrollo de cáncer de colon (Goetz y col., *Science* 228: 187-290 [1985]). La interferencia con la metilación *in vivo* puede conducir a formación de

tumores. Se ha indicado que el suministro de inhibidores de metilación tales como L-metionina o 5-azacitodina o deficiencia grave de 5-adenosin metionina a través del suministro de una dieta pobre en lipótopos induce formación de tumores de hígado en ratas (Wainfan y col., *Cancer Res.* 52: 2071s-2077s [1992]). Los estudios muestran que dietas extremadamente deficientes en lipótopos pueden provocar pérdida de grupos metilo en sitios específicos en genes tales como c-myc, ras y c-fos (Dizik y col., *Carcinogenesis* 12: 1307-1312 [1991]). Se produce hipometilación a pesar de la presencia de niveles elevados de actividad ADN MTasa (Wainfan y col., *Cancer Res.* 49: 4094-4097 [1989]). Los genes requeridos para proliferación activa prolongada se inactivan a medida que se metilan durante la diferenciación y los genes específicos de tejido se hipometilan y están activos. La hipometilación puede después desplazar el equilibrio entre los dos estados. En algunas realizaciones, aprovechando estos fenómenos de origen natural, la mezcla de la presente invención puede adaptarse para metilación específica de sitio de promotores génicos específicos, evitando de este modo la transcripción y por lo tanto la traducción de ciertos genes. En otras realizaciones, la mezcla de la presente invención puede adaptarse para regular positivamente la expresión de un gen de interés (por ejemplo, un gen supresor de tumores) alterando los patrones de metilación del gen.

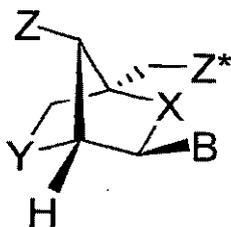
La presente invención no se limita al uso de oligonucleótidos de ADN_i metilados. De hecho, el uso de oligonucleótidos de ADN_i no metilados para la inhibición de la expresión génica se contempla específicamente por la presente invención.

Los oligonucleótidos de ADN_i pueden estar en un estado de origen natural, y también pueden contener modificaciones o sustituciones en las bases nucleicas, el resto de azúcar y/o en el enlace internucleosídico.

Las bases nucleicas comprenden bases nucleicas de origen natural así como bases nucleicas de origen no natural. Los ejemplos ilustrativos de dichas bases nucleicas incluyen sin limitación adenina, citosina, 5-metilcitosina, isocitosina, seudoisocitosina, guanina, timina, uracilo, 5-bromouracilo, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina, 5-propinil-6-fluoroluracilo, 5-metilthiazoleuracilo, 6-aminopurina, 2-aminopurina, inosina, diaminopurina, 7-desazaguanina, 7-desazaadenina, 3-desazaguanina, 3-desazaadenina, 8-azaguanina, 8-azaadenina, 7-propin-7-desazaadenina, 7-propin-7-desazaguanina, 2-cloro-6-aminopurina, 4-acetilcitosina, 5-hidroximetilcitosina, 8-hidroxi-N6-metiladenosina, aziridinilcitosina, 5-(carboxihidroxil-metil) uracilo, 5-fluorouracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouracilo, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, N6-isopenteniladenina, 1-metiladenina, 1-metilpseudouracilo, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, N6-metiladenina, 7-metilguanina y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-propil adenina y otros derivados de alquilo de adenina y guanina, 2-aminoadenina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético metiléster, ácido uracil-5-oxiacético, oxibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 2-tiotimina, 5-halouracilo, 5-halocitosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas 8 sustituidas, 5-trifluorometil uracilo y citosina, metiléster de ácido N-uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético, queosina, xantina, hipoxantina, 2-tiocitosina, 2,6-diaminopurina, pirimidinas 5 sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-amino-propiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina.

Los oligonucleótidos de ADN_i también pueden tener azúcares distintos de ribosa y desoxirribosa, incluyendo arabinofuranosa (descrita en la Publicación Internacional número WO 99/67378, que se incorpora en el presente documento por referencia), xiloarabinofuranosa (descrita en las Patentes de Estados Unidos N^o 6.316.612 y 6.489.465, que se incorporan en el presente documento por referencia), α -treofuranosa (Schöning, y col. (2000) *Science*, 290, 1347-51, que se incorpora en el presente documento por referencia) y L-ribofuranosa. Los miméticos de azúcar pueden reemplazar al azúcar en los nucleótidos. Estos incluyen ciclohexeno (Wang y col. (2000) *J. Am. Chem. Soc.* 122, 8595-8602; Vebeure y col. *Nucl. Acids Res.* (2001) 29, 4941-4947, que se incorporan en el presente documento por referencia), un grupo tricíclico (Steffens, y col. *J. Am. Chem. Soc.* (1997) 119, 11548-11549, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo ciclobutílico, un grupo hexitol (Maurinsh, y col. (1997) *J. Org. Chem.* 62, 2861-71; *J. Am. Chem. Soc.* (1998) 120, 5381-94, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo altritol (Allart, y col., *Tetrahedron* (1999) 6527-46, que se incorpora en el presente documento por referencia), un grupo de pirrolidina (Scharer, y col., *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 6623-24, que se incorpora en el presente documento por referencia), grupos carbocíclicos obtenidos reemplazando el oxígeno del anillo de furanosa con un grupo de metileno (Froehler y Ricca, *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8230-32, que se incorpora en el presente documento por referencia) o con un S para obtener 4'-tiofuranosa (Hancock, y col., *Nucl. Acids Res.* 21, 3485-91, que se incorpora en el presente documento por referencia) y/o grupo morfolino (Heasman, (2002) *Dev. Biol.*, 243, 209-214, que se incorpora en el presente documento por referencia) en lugar del azúcar de pentofuranosilo. Están disponibles en el mercado oligonucleótidos morfolino de Gene Tools, LLC (Corvallis Oregon, Estados Unidos).

Los oligonucleótidos de ADN_i también pueden incluir "ácidos nucleicos bloqueados" o LNA. Los LNA pueden ser bicíclicos, tricíclicos y policíclicos. Los LNA incluyen varios monómeros diferentes, uno de los cuales se representa en la Fórmula I.



I

en la que

B constituye una base nucleica;

Z* se selecciona de un enlace internucleosídico y un grupo terminal;

5 Z se selecciona de un enlace con el enlace internucleosídico de un nucleótido/nucleósido precedente y un grupo terminal, siempre que solamente uno de Z y Z* pueda ser un grupo terminal;

X y Y se seleccionan de forma independiente de -O-, -S-, -N(H)-, -N(R)-, -CH₂- o -C(H)=, CH₂-O-, -CH₂-S-, -CH₂-N(H)-, -CH₂-N(R)-, -CH₂-CH₂- o -CH₂-C(H)=, -CH=CH-; siempre que X y Y no sean ambos O.

Además de los monómeros de LNA [2'-Y,4'-C-metilen-β-D-ribofuranosilo] representados en la fórmula XVIII (a [2,2,1] bicloneucleósido), un nucleótido LNA o LNA* también puede incluir "ácidos nucleicos bloqueados" con otra furanosa u otros anillos de 5 o 6 miembros y/o con una formulación de monómero diferente, incluyendo bicloneucleósidos ligados con 2'-Y,3' y ligados con 3'-Y,4', ligados con 1'-Y,3, ligados con 1'-Y,4', ligados con 3'-Y, 5', ligados con 2'-Y, 5', ligados con 1'-Y,2' y otros. Todos los LNA anteriormente mencionados pueden obtenerse con diferentes centros quirales, dando como resultado, por ejemplo, monómeros de LNA [3'-Y,4'-C-metilen (o etilen)-β (o α)-arabino-, xilo- o L-ribo-furanosilo]. Los oligonucleótidos de LNA y nucleótidos de LNA se describen en general en la Publicación Internacional N° WO 99/14226 y solicitudes posteriores; las Publicaciones Internacionales N° WO 00/56746, WO 00/56748, WO-00/66604, WO 01/25248, WO 02/28875, WO 02/094250, WO 03/006475; Patentes de Estados Unidos N° 6.043.060, 6268490, 6770748, 6639051 y Publicaciones de Estados Unidos N° 2002/0125241, 2003/0105309, 2003/0125241, 2002/0147332, 2004/0244840 y 2005/0203042, todas las cuales se incorporan en el presente documento por referencia. Los oligonucleótidos de LNA y oligonucleótidos análogos de LNA están disponibles en el mercado de, por ejemplo, Proligo LLC 6200 Lookout Road, Boulder, CO 80301 Estados Unidos.

Los derivados de nucleótidos de los oligonucleótidos de ADNi pueden incluir nucleótidos que contienen uno de los siguientes en la posición de azúcar 2': OH; F; O-, S- o N-alquilo; O-, S- o N-alqueno; O-, S- o N-alquino; u O-alquil-O-alquilo, en los que el alquilo, alqueno y alquino pueden ser alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o no sustituidos, O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂ y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, en los que n y m son de 1 a aproximadamente 10, alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, 2'-metoxietoxi (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin y col., Helv. Chim. Acta 78: 486 [1995]), es decir, grupo alcoxicoxi, 2'-dimetilaminoetoxietoxi (es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂), también conocido como 2'-DMAOE y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (también conocido en la técnica como 2'-O-dimetilaminoetoxietilo o 2'-DMAEOE), es decir, 2'-O-CH₂-O-CH₂-N(CH₂)₂, 2'-metoxi (2'-O-CH₃), 2'-aminopropoxi(2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden realizarse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido de ADNi, particularmente en la posición 3' del azúcar en el nucleótido terminal 3' o en oligonucleótidos de ADNi ligados 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'.

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADNi tienen enlaces internucleosídicos no naturales. Como se define en la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen los que conservan un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Para los fines de la presente memoria descriptiva, los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal internucleosídica también pueden considerarse oligonucleósidos.

Algunas cadenas principales de oligonucleótidos de ADNi modificadas incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosforoselenatos, fosfortriésteres, aminoalquilfosfortriésteres, metil y otros alquil fosfonatos incluyendo 3'-alquilen fosfonatos fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfortriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos ligados 2'-5' de estos y los que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades nucleosídicas están ligados 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas de ácido libre.

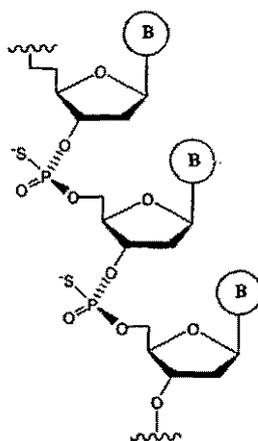
Otras cadenas principales de oligonucleótidos de ADNi modificados que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen cadenas principales que están formadas por enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces

internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen los que tienen enlaces morfolino (formados en parte de la parte de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacético y tioformacético; cadenas principales de metileno formacético y tioformacético; cadenas principales que contienen alqueno; cadenas principales de sulfamato, cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidazino; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otros que tienen partes componentes de N, O, S y CH₂ mixtas.

En otros miméticos de oligonucleótidos de ADN más, tanto el enlace de azúcar como el internucleosídico (es decir, la cadena principal) de las unidades de nucleótidos se reemplazan con grupos nuevos. Estas unidades de bases se mantienen para hibridación con un compuesto diana de ácido nucleico apropiado. Un compuesto oligomérico tal, un mimético de oligonucleótido que se ha mostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, se denomina ácido péptido nucleico (PNA). En compuestos de PNA, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las bases nucleicas se conservan y se unen directa o indirectamente a átomos de nitrógeno de la parte de amida de la cadena principal. Las patentes representativas que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero sin limitación, las Patentes de Estados Unidos N^o 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262, cada una de las cuales se incorpora en el presente documento por referencia. Pueden encontrarse enseñanzas adicionales de compuesto de PNA en Nielsen y col., Science 254: 1497 (1991).

En algunas realizaciones, los oligonucleótidos de ADN de la invención son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular -CH₂-, -NH-O-CH₂-, -CH₂-N(CH₃)-O-CH₂- [conocida como una cadena principal de metileno (metilimino) o MMI], -CH₂-O-N(CH₃)-CH₂-, --CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂- y -O-N(CH₃)-CH₂-CH₂- [en la que la cadena principal de fosfodiéster nativa se presenta como -O-P-O-CH₂-] de la Patente de Estados Unidos N^o 5.489.677 a la que se ha hecho referencia anteriormente, y las cadenas principales de amida de la Patente de Estados Unidos N^o 5.602.240 a la que se ha hecho referencia anteriormente. Los oligonucleótidos también pueden tener una estructura de cadena principal de morfolino de la Patente de Estados Unidos N^o 5.034.506 a la que se ha hecho referencia anteriormente.

En algunas realizaciones los oligonucleótidos de ADN tienen una cadena principal de fosforotioato que tiene la siguiente estructura general.



Otra modificación de los oligonucleótidos de ADN de la presente invención implica añadir nucleótidos adicionales a los extremos 3' y/o 5' de los oligonucleótidos de ADN. Las colas de 3' y 5' pueden comprender cualquier nucleótido y pueden ser tan cortas como un nucleótido y tan largas como 20 nucleótidos.

Otra modificación más de los oligonucleótidos de ADN de la presente invención implica unir químicamente con el oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencian la actividad, distribución celular o captación celular del oligonucleótido. Dichos restos incluyen pero sin limitación restos lipídicos tales como un resto de colesterol, ácido cólico, un tioéter (por ejemplo, hexil-S-tritilol), un tiocolesterol, una cadena alifática, (por ejemplo, restos de dodecandiol o undecilo), un fosfolípido (por ejemplo, di-hexadecil-rac-glicerol o trietilamonio 1,2-di-O-hexadecil-rac-glicero-3-H-fosfonato), una poliamina o una cadena de polietilenglicol o ácido adamantano acético, un resto de palmitilo, o un resto de octadecilamina o hexilamino-carbonil-oxicolesterol.

Un experto en la materia relevante sabe bien cómo generar oligonucleótidos que contengan las modificaciones anteriormente descritas. La presente invención no se limita a los oligonucleótidos de ADN descritos anteriormente. Puede utilizarse cualquier modificación o sustitución adecuada, siempre que el oligonucleótido de ADN sea un oligonucleótido de ácido nucleico monocatenario o derivado del mismo, cuya secuencia es complementaria, en parte, de una parte de la región no transcrita más larga de un gen en el que el oligonucleótido afecta indirecta o directamente a la expresión, regulación o producción del mismo o diferente gen, en el que la región no transcrita

más larga incluye cualquier parte del gen que no se transcriba cuando el sitio de inicio de la transcripción es el sitio más cercano al sitio de inicio de la traducción. Los oligonucleótidos de ADN_i no incluyen ARN_i y oligonucleótidos antisentido que forman pares de bases solamente con ARN_m o pre ARN_m e interfieren con el procesamiento de ARN y/o traducción de mensajes.

- 5 No es necesario modificar uniformemente todas las posiciones en un compuesto dado, y de hecho puede incorporarse más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas en un compuesto único o incluso en un nucleósido único dentro de un oligonucleótido de ADN_i. La presente invención también incluye composiciones y formulaciones farmacéuticas que incluyen los compuestos oligonucleotídicos de ADN_i de la presente invención como se describe posteriormente.

10 5. Preparación y formulación de oligonucleótidos de ADN_i

- 15 Puede usarse cualquiera de los procedimientos conocidos de síntesis de oligonucleótidos para preparar los oligómeros de ADN_i modificados de la presente invención. En algunas realizaciones, utilizando oligonucleótidos de ADN_i metilados, el nucleótido dC se reemplaza por 5-metil-dC cuando sea apropiado, como se enseña por la presente invención. Los oligonucleótidos de ADN_i modificados o no modificados de la presente invención se preparan más convenientemente usando cualquiera de los sintetizadores de ácido nucleico automáticos disponibles en el mercado. También pueden obtenerse de fuentes comerciales que sintetizan oligonucleótidos adaptados según las especificaciones del cliente.

En realizaciones adicionales, pueden combinarse agentes quimioterapéuticos, incluyendo docetaxel y otros con oligómeros de ADN_i antes o durante el secuestro de liposomas.

20 **C. Formulaciones de liposomas anfóteros**

1. Descripción

- 25 Ventajosamente, las formulaciones de liposomas anfóteros de la mezcla de la presente invención (1) muestran baja toxicidad; (2) pueden secuestrar altas concentraciones de oligómeros de ADN_i, por ejemplo, la eficacia de secuestro de los oligonucleótidos de ADN_i asociados con los liposomas anfóteros es al menos aproximadamente del 35 %; (3) son estables en el torrente sanguíneo, tal como cuando se administran por vía sistémica, de modo que el oligonucleótido y/u otros agentes se secuestran de forma estable en los liposomas hasta la captación eventual en el tejido o las células diana, (4) pueden optimizarse para suministro a animales, tal como ajustando la concentración de oligonucleótido de ADN_i secuestrado a entre aproximadamente 1 y 4 mg/ml (tal como aproximadamente 2 mg/ml) para una concentración de lípidos de aproximadamente 10 a 100 mM o menos que proporciona dosificación a 10 mg/kg en 200 µl de volumen de inyección; y (5) puede producirse con un tamaño de liposomas anfóteros medio que es menor de 200 nm, tal como aproximadamente 100 nm, lo que maximiza la penetración tumoral.

Como se ha descrito anteriormente, los liposomas anfóteros incluyen uno o más oligonucleótidos de ADN_i, uno o más lípidos anfóteros o una mezcla de componentes lipídicos aniónicos y catiónicos con propiedades anfóteras y uno o más lípidos neutros.

- 35 En general, los lípidos catiónicos o cargas positivas en los lípidos anfóteros actúan para unir oligonucleótidos de ADN_i. Los lípidos aniónicos, tales como CHEMS, o cargas aniónicas en lípidos anfóteros y lípidos neutros, tales como fosfatidiletanolaminas posibilitan las propiedades fusogénicas de los liposomas anfóteros.

- 40 En algunas realizaciones de la presente invención, los liposomas anfóteros pueden formarse a partir de una fase lipídica que comprende un lípido anfótero. La fase lipídica puede comprender del 5 al 30 % molar o del 10 al 25 % molar del lípido anfótero. Como alternativa, los liposomas anfóteros pueden formarse a partir de una fase lipídica que comprende una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras. La cantidad total de lípidos cargados puede variar del 5 al 95 % molar, del 20 al 80 % molar o del 30 al 70 % molar de la mezcla lipídica.

- 45 La relación del porcentaje de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos puede estar entre aproximadamente 3 y 0,5 o entre aproximadamente 2 y 0,5. En algunas realizaciones, la relación de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos es de aproximadamente 2. En otras realizaciones, la relación de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos es de aproximadamente 1. En otras realizaciones, la relación de lípidos catiónicos y lípidos aniónicos es de aproximadamente 0,5.

- 50 Los pares específicos de lípidos catiónicos y aniónicos incluyen, sin limitación, MoChol y CHEMS, DOTAP y CHEMS, MoChol y Cet-P y MoChol y DMGSucc. Los ejemplos de pares de lípidos cargados incluyen además, sin limitación, entre aproximadamente el 10 y el 60 % molar de MoChol y entre aproximadamente el 10 y el 30 % molar de CHEMS; entre aproximadamente el 5 y el 30 % molar de DOTAP y entre aproximadamente el 10 y el 30 % molar de CHEMS; entre aproximadamente el 10 y el 40 % molar de MoChol y entre aproximadamente el 5 y el 30 % molar de Cet-P; y entre aproximadamente el 20 y el 60 % molar de MoChol y entre aproximadamente el 20 y el 60 % de DMGSucc.

- 55 Los liposomas anfóteros también contienen lípidos neutros, que pueden ser esteroides o fosfolípidos, y mezclas de

los mismos. Los liposomas anfóteros incluyen lípidos neutros en una cantidad entre aproximadamente el 5 y el 95 % molar de la mezcla lipídica, entre aproximadamente el 20 y el 80 % molar, o entre aproximadamente el 30 y el 70 % molar.

5 Varias combinaciones de lípidos neutros son útiles en la formación de liposomas anfóteros, tales como POPC y DOPE; y POPC y colesterol. Por el contrario, no se prefiere una combinación de los lípidos neutros DOPE y colesterol. En algunas realizaciones, la mezcla de lípidos neutros incluye del 5 al 40 % molar de POPC y del 20 al 50 % molar de DOPE; o del 10 al 50 % molar de POPC y del 30 al 50 % molar de colesterol. La relación del porcentaje de lípidos cargados y lípidos neutros puede ser entre aproximadamente 3 y 0,2. En algunas realizaciones, la relación del porcentaje de lípidos cargados y lípidos neutros es de aproximadamente 2. En otras realizaciones, la relación del porcentaje de lípidos cargados y lípidos neutros es de aproximadamente 0,5.

10 Los ejemplos de combinaciones específicas de lípidos cargados y neutros para secuestrar un oligómero de ADN_i, tal como PNT-100 (SEC ID N°: 1251), incluyen POPC, DOPE, MoChol y CHEMS; POPC, DOPE, DMGSucc y MoChol; POPC, DOTAP, CHEMS y colesterol; y POPC, MoChol, Cet-P y colesterol. En algunas realizaciones, el liposoma anfótero para secuestrar un oligómero de ADN_i, tal como SEC ID N°: 1251, incluye 3-20 % molar de POPC, del 10 al 60 % molar de DOPE, del 10 al 60 % molar de MoChol y del 10 al 60 % molar de CHEMS. El liposoma anfótero puede incluir POPC/DOPE/MoChol/CHEMS en relaciones molares de aproximadamente 6/24/47/23 y aproximadamente 15/45/20/20. En otra realización, los liposomas anfóteros incluyen 3-20 % molar de POPC, del 10 al 40 % molar de DOPE, del 15 al 60 % molar de MoChol y del 15 al 60 % molar de DMGSucc. El liposoma anfótero puede incluir POPC/DOPE/DMGSucc/MoChol en relaciones molares de aproximadamente 6/24/23/47 y aproximadamente 6/24/47/23. En otra realización más, el liposoma anfótero incluye del 10 al 50 % molar de POPC, del 20 al 60 % molar de Chol, del 10 al 40 % molar de CHEMS y del 5 al 20 % molar de DOTAP. El liposoma anfótero puede incluir POPC/Chol/CHEMS/DOTAP en una relación molar de aproximadamente 30/40/20/10. En otra realización más, el liposoma anfótero incluye del 10 al 40 % molar de POPC, del 20 al 50 % molar de Chol, del 5 al 30 % molar de Cet-P y del 10 al 40 % molar de MoChol. El liposoma anfótero puede incluir POPC/Chol/Cet-PiMoChol en una relación molar de aproximadamente 35/35/10/20.

15 En general, puede usarse cualquier par lipídico de Anfótero I, II o III de lípidos catiónicos y aniónicos junto con lípidos neutros para formar liposomas siempre que el liposoma resultante sea anfótero, muestre estabilidad en suero, tenga baja toxicidad, secuestre una amplia cantidad de los oligonucleótidos de ADN_i, por ejemplo, a una eficacia de aproximadamente el 35 % (aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 % o superior) y proporcione un ajuste de la concentración de oligonucleótidos de ADN_i a al menos 2 mg/ml para una concentración de lípido de 100 mM o menos.

2. Preparación de los liposomas anfóteros

20 Los liposomas anfóteros de ADN_i de la invención pueden prepararse por procedimientos convencionales para preparar y adaptar el tamaño de liposomas conocidos por los expertos en la materia. Estos incluyen hidratación de películas lipídicas y polvos, inyección de disolvente y evaporación de fase inversa. Con frecuencia se formarán vesícula multilamelares de forma espontánea cuando se hidraten lípidos anfífilicos, mientras que la formación de vesículas unilamelares pequeñas habitualmente requiere un procedimiento que implica introducción de energía sustancial, tal como ultrasonificación, homogeneización a alta presión, inyección de soluciones lipídicas en etanol en una fase acuosa que contenga los oligonucleótidos de ADN_i para secuestro y/o extrusión a través de filtros o membranas de tamaño de poro definido. Se han descrito procedimientos para preparar y caracterizar liposomas, por ejemplo, por S. Vemuri y col. (Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. Pharm Acta Helv. 1995, 70(2): 95-111.).

25 Puede ponerse en contacto una solución del oligonucleótido ADN_i con un excipiente a un pH neutro, dando como resultado de este modo un procedimiento de carga pasiva de un cierto porcentaje de la solución. El uso de altas concentraciones del excipiente, que varían de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM, es un procedimiento para conseguir encapsulación sustancial del agente activo. Los excipientes incluyen sustancias que pueden iniciar o facilitar la carga de oligonucleótidos de ADN_i. Los ejemplos de excipientes incluyen, sin limitación, ácido, formas de sodio o amonio de aniones monovalentes tales como cloruro, acetato, lactobionato y formato; aniones divalentes tales como aspartato, succinato y sulfato, e iones trivalentes tales como citrato y fosfato.

30 Los liposomas anfóteros usados con la presente invención ofrecen la ventaja clara de unión a oligonucleótidos en o por debajo de su punto isoeléctrico, concentrando de este modo el agente activo en la superficie del liposoma. El procedimiento de carga avanzada se describe en más detalle en la Publicación Internacional de PCT Número WO02/066012.

35 Para formar liposomas unilamelares, se aplica una fuerza de cizallamiento a la dispersión acuosa de la mezcla de lípido con oligonucleótido de ADN_i. La fuerza de cizallamiento puede aplicarse por sonicación, usando un aparato microfluidificador tal como un homogeneizador o prensa francesa, inyección, congelación y descongelación, retirando por diálisis una solución de detergente de lípidos, ultrafiltración, extrusión a través de filtros u otros procedimientos conocidos usados para preparar liposomas. El tamaño de los liposomas puede controlarse usando una diversidad de técnicas conocidas, incluyendo la duración de la fuerza de cizallamiento.

60

Los oligómeros de ADNi no incluidos pueden retirarse de la dispersión de liposomas anfóteros mediante intercambio de tampón usando diálisis, cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, resina Sephadex G-50), ultrafiltración (punto de corte de peso molecular 100.000-300.000) o centrifugación.

5 En una realización, pueden fabricarse liposomas anfóteros cargados con oligonucleótidos de ADNi mediante una extrusión mecánica. Una vez que los lípidos están mezclados con los oligonucleótidos, estos pueden extraerse usando extrusión mecánica, en la que la máquina se describe en la Patente de Estados Unidos N° 6843942 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0032037. Los liposomas se cargan y filtran de modo que el diámetro de liposoma esté entre 50 nm y 200 nm, la eficacia de encapsulación del oligonucleótido sea al menos aproximadamente 35 % y los liposomas resultantes tengan una concentración de oligonucleótidos de ADNi de al menos 2 mg/ml a una concentración de lípidos de 10 a 100 mM o menos.

VII. Tratamiento de animales o células con liposomas anfóteros que secuestren oligómeros de ADNi

15 Las composiciones de la invención son útiles para tratar animales, incluyendo seres humanos, o células para tratar cáncer, tal como inhibiendo o reduciendo el crecimiento tumoral. El animal puede ser un animal no humano, incluyendo ratones, caballos, gatos, perros u otros animales o puede ser un ser humano. En una realización, la mezcla se introduce al animal a una dosificación de entre 1 mg y 100 mg/kg de peso corporal. En otra realización, los liposomas anfóteros pueden introducirse al animal una o más veces al día o de forma continua.

20 La mezcla puede administrarse al animal mediante diferentes vías. La administración puede ser tópica (incluyendo oftálmica y a membranas mucosas incluyendo suministro vaginal y rectal), pulmonar (por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo por nebulizador; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección o infusión intravenosa, intraarterial, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o administración intracraneal, por ejemplo, intratecal o intraventricular. La administración también puede ser mediante un dispositivo médico.

25 Los liposomas pueden administrarse a células cultivadas derivadas de diversos cánceres, incluyendo cáncer pancreático, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, leucemia, cáncer de próstata, linfoma, cáncer ovárico o melanoma.

30 Los liposomas pueden usarse para dirigir oligonucleótidos de ADNi a tejidos seleccionados usando varias técnicas. Los procedimientos implican manipular el tamaño de los liposomas, su carga superficial neta así como la vía de administración. Manipulaciones más específicas incluyen marcar los liposomas con ligandos de receptor, incluyendo ligandos de receptor nuclear y de membrana o anticuerpos para tejidos o células específicos. Los anticuerpos o ligandos pueden unirse a la superficie de los liposomas.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

Ejemplos

Ejemplo 1. Materiales

35 La síntesis de MoChol y HisChol se describió en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0131666 (documento WO 02/066490). Los otros lípidos están disponibles de fuentes comerciales. Por ejemplo, DOTAP y Colesterol están disponibles de Merck, DMG-Succ está disponible de Chiroblock GmbH, CHEMS puede obtenerse de Sigma Chemical Company, DPPG, DOPE y POPC están disponibles de Genzyme o Lipoid GMBH y la fosfatidilcolina de Huevo está disponible de Lipoid GMBH.

40 Ejemplo 2. Producción de liposomas anfóteros cargados con oligonucleótidos de ADNi

45 La composición lipídica de los liposomas así como los procedimientos para prepararlos se seleccionan de modo que la eficacia de encapsulación sea de aproximadamente el 35 % o mayor y el tamaño de los liposomas sea menor de 200 nm, y óptimamente cerca de 100-120 nm para maximizar la penetración tumoral. Para administrar a animales, la concentración de oligonucleótidos de ADNi es preferentemente al menos 2 mg/ml a una concentración de lípidos de 100 mM o menos. Esto permite dosificar a 10 mg/kg en 200 µl de volumen de inyección.

Los liposomas se producen por un procedimiento de extrusión / hidratación /película lipídica modificada. Los lípidos se disuelven en cloroformo o cloroformo/metanol y se secan completamente en un evaporador rotatorio. Las películas lipídicas se hidratan a continuación con diversas cantidades de los oligonucleótidos de ADNi SEC ID N°: 1251 (PNT100) o el complemento de PNT-100 (PNT-100R) hidratados en tampón.

50 A. Procedimiento de carga avanzado

Se hidratan 2400 µmoles de lípido con NaOAc 10 mM, NaCl 150 mM (pH ajustado usando citrato) que contiene de 48,8 a 95,2 mg de oligonucleótidos de ADNi durante 30 minutos a 40 °C. Después de tres etapas de congelación-descongelación, las vesículas multilamelares resultantes se pasan varias veces a través de una membrana de

policarbonato (tamaño de poro de 100 nm) usando bombas de alta presión. Inmediatamente después de la etapa de extrusión, el pH de la suspensión de liposomas se desplaza a pH 7,5. La suspensión resultante se sedimenta a 25 s usando rotores T865 (Sorvall Ultra Pro80) o TLA 100.4 (Beckman Optima-MAX) para retirar oligonucleótido de ADN_i no secuestrado y para intercambiar el tampón con solución salina tamponada con fosfato (PBS).

5 *B. Procedimiento de carga pasiva*

La película lipídica se hidrata con PBS que contiene 405 mg de oligonucleótidos de ADN_i durante 1 hora a 40 °C a una concentración de lípidos final de 100 mM. Después de tres etapas de congelación-descongelación, las vesículas resultantes se extruyen a través de una pila de membranas de policarbonato que contienen diferentes tamaños de poro entre 100 y 800 nm. La suspensión resultante se sedimenta tres veces a 25s (PBS es Solución Salina Tamponada con Fosfato, que tiene la fórmula: Na₂PO₄ 10,1 mM, KH₂PO₄ 1,76 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7,5.)

C. Extrusión mecánica

Las vesículas se preparan por el procedimiento de carga pasivo o avanzado y se extruyen usando un dispositivo para producir vesículas lipídicas.

15 Las propiedades de partícula se midieron usando un Zetasizer 3000 HAS (Malvern). Los liposomas se diluyeron en tampón apropiado hasta una concentración de lípidos final de 0,2-0,6 mM. Los valores de los tamaños se registraron como media de Z y la distribución de tamaño se calculó en el modo multimodal. Para la medición del potencial de Zeta, también se diluyeron liposomas a concentración 0,2-0,6 mM.

Tabla 2 Formulaciones de Liposomas

Formulación	Composición	Relaciones Molares
A	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	15/45/20/20
B	POPC/DOTAP/CHEMS/Chol	30/10/20/40
C	POPC/MoChol/Cet-P/Chol	35/20/10/35
D	POPC/DOPE/MoChol/CHEMS	6/24/47/23
E	POPC/DOPE/MoChol/DMG-Succ	6/24/47/23
F	POPC/DOPE/MoChol/DMG-Succ	6/24/23/47

20 Para todas las formulaciones en la Tabla 2, la carga activa usando extrusión manual o mecánica en general dio mejores resultados. Las eficacias de encapsulación variaron del 37 al 77 %, el tamaño de los liposomas varió de 124 a 201 nm y la concentración de oligonucleótidos de ADN_i a una concentración de lípidos de 100 mM varió de 1,1 a 3,5 mg/ml. La extrusión mecánica dio resultados similares a la extrusión manual con la posible excepción de que la extrusión mecánica dio como resultado un tamaño de liposomas más uniforme, que variaba de 135 a 179 nm. La extrusión mecánica se prefiere para volúmenes mayores.

25 El procedimiento de carga pasiva dio como resultado menores eficacias de encapsulación, que variaban del 11 al 21 %. Sin embargo, el tamaño de liposomas varió de 122 a 182 nm y la concentración de oligonucleótidos a una concentración de lípidos de 100 mM varió de 2,0 a 3,7 mg/ml. Todas las formulaciones que se cargaron de forma pasiva se extruyeron manualmente debido a que los intentos de extrusión mecánica crearon una alta contrapresión.

30 El procedimiento de carga avanzada no pudo usarse para todas las formulaciones debido a la baja capacidad de carga de las formulaciones que contienen menos del 20 % de lípido catiónico. En consecuencia, la formulación B con DOTAP al 10 %, no pudo cargarse eficazmente por el procedimiento de carga avanzada, y se usó el procedimiento de carga pasiva.

35 Se descubrió que una relación de carga de lípido catiónico y carga de lípido aniónico a pH bajo (N/P) de 3,3 era el mejor acuerdo para producir partículas pequeñas, alta eficacia de encapsulación y concentración de oligonucleótidos de ADN_i y concentración de lípidos de al menos 2,0 mg/ml de oligonucleótidos de ADN_i a una concentración de lípidos de 10 a 100 mM.

D. Preparación de PNT 2254 y PNT 2253

40 Se producen liposomas con un procedimiento de inyección de etanol modificado. Brevemente, se mezclaron de forma continua 3 volúmenes de etanol, que contenían la mezcla de lípido D (POPC/DOPE/MoChol/Chems 6:24:47:23) (133 mM, calentado a 55 °C) y 8 volúmenes de NaAc 20 mM/Sacarosa 300 mM/pH 4, que contenía

PNT100 (SEC ID N°: 1251) o PNT100-R (SEC ID N°: 1288) 2,71 mg/ml en caso de producción de PNT2254 o PNT2254R, o que contenía PNT100 1,36 mg/ml en caso de producción de PNT2253, usando un dispositivo de inyección como se desvela en la Patente de Estados Unidos 6843942 y la solicitud de patente de Estados Unidos N° 2004/0032037. La mezcla ácida se desplazó a pH 7,5 mediante una etapa de mezcla continua adicional con 32 volúmenes de NaCl 100 mM / Fosfato 136 mM / pH 9. La suspensión liposomal resultante se concentró 10 veces y se dializó frente a PBS, pH 7,4 para retirar por lavado PNT100 o PNT100-R no encapsulado y exceso de etanol.

Ejemplo 3. Resistencia a suero de y filtración de oligonucleótidos de ADNi de liposomas anfóteros

Las relaciones lipídicas pueden optimizarse tanto para estabilidad de los liposomas en suero como para filtración mínima de los oligonucleótidos de ADNi. Las formulaciones anteriores son estables en suero y pueden mostrar mínima filtración de oligonucleótido.

Ejemplo 4. Respuesta de tumores WSU-DLCL2 a PNT-100

Se ensayaron tres formulaciones que cumplían las especificaciones de al menos 2 mg/ml de PNT-100 (SEC ID N°: 1251) encapsulado, más de 40 % de eficacia de encapsulación y menos de 200 nm de tamaño de partícula (formulaciones B, D y F, véase ejemplo 2) en un modelo de linfoma humano. Se obtuvieron células de linfoma (Linfoma de Células Grandes Difuso de la Universidad Estatal Wayne WSU-DLCL₂) del Dr. Ramzi Mohammad, Instituto del Cáncer de Karmanos, Universidad Estatal Wayne. Los xenoinjertos se trasplantaron por vía subcutánea en ratones C17/SCID. Siete días después del trasplante, se inyectó a los ratones por vía intravenosa 10 mg/kg de las formulaciones de PNT-100 (SEC ID N°: 1251) y 10 mg/kg de las formulaciones de PNT-100R (SEC ID N°: 1288). Las inyecciones se realizaron diariamente durante 8 días en seis ratones. El tamaño de los tumores se midió hasta 30 días después de la implantación. Todos los animales sobrevivieron sin ninguna patología tóxica global.

Los resultados de la Figura 1 muestran que PNT-100 ralentiza el crecimiento tumoral. 340.9 y 340.8 son formulaciones con PNT-100 y PNT-100R, respectivamente. La formulación D con PNT-100 ralentizó el crecimiento tumoral mejor y fue menos tóxica que las formulaciones B y F (datos no mostrados).

Los experimentos realizados con otros lotes de formulación D de liposoma-PNT-100 dieron resultados similares, como se muestra en la Figura 2. Se administró a los ratones PNT2253 10 mg/kg diariamente durante ocho días, una inyección de embolada i.v. y se midió por calibrador la respuesta del volumen tumoral (panel izquierdo). Los datos muestran inhibición del crecimiento tumoral al 57 % el día 28 después del trasplante de xenoinjerto o 14 días después del tratamiento farmacológico (n =6; p = 0,004). Se administró a los ratones PNT2253 10 mg/kg diariamente durante cinco días, una inyección de embolada i.v., y se midió por calibrador la respuesta tumoral. Los datos muestran inhibición del crecimiento tumoral al 46 % el día 26 después del trasplante de xenoinjerto o 19 días después del tratamiento farmacológico (n=8; p= 0,007). Los estudios se concluyeron cuando los xenoinjertos en animales de control alcanzaron >2000 mm³.

La carga tumoral se calculó a partir de las mediciones de tamaños de los tumores. La Figura 3 muestra que la carga tumoral en los ratones tratados con PNT2253, que es PNT-100 en la formulación D, fue drásticamente menor que la carga tumoral en ratones tratados con PNT2253R (PNT-100R en la formulación D) o PBS.

Se realizó un experimento de respuesta a dosis en ratones que portaban xenoinjerto WSU-DLCL2 con PNT-100 en la formulación D, con una concentración de PNT-100 de 4 mg/ml (PNT2254) y 2 mg/ml (PNT2253). Se proporcionaron ratones C.B.-17 ACID de entre 6 y 8 semanas de edad por Taconic (Hudson, NY). Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 100 mm³ de volumen, se inició el tratamiento con PNT2253 o PNT2254. Los ratones recibieron 0, 0,3, 3, 10 o 20 mg/kg de PNT2254 diariamente durante cinco días, 30 mg/kg de PNT2254 diariamente durante 2 días, 60 mg/kg de PNT2254 una vez, 0,3, 3 o 10 mg/kg de PNT2253 diariamente durante 5 días, 20 mg/kg de PNT2253 diariamente durante 2 días o 30 mg/kg de PNT2253 una vez mediante una inyección de embolada i.v. (n=7 (PNT2254) u 8 (PNT2253)). Los animales se comprobaron al menos tres veces por semana con respecto a crecimiento tumoral por mediciones con calibrador, y los animales se pesaron al menos tres veces por semana. Los volúmenes tumorales de todos los grupos de tratamiento se analizaron usando software estadístico Graph-Pad™.

Se estableció una dosis máxima tolerada de 20 mg/kg/día de PNT2254 y 10 mg/kg/día de PNT2253 (Figuras 4 y 5). Se consiguió toxicidad a 30 mg/kg/día para PNT2254 y a 20 mg/kg/día para PNT2253, y se detuvo la dosificación después de dos días debido a la eficacia animal. Se vio una respuesta a dosis alta con fuerte eficacia antitumoral durante un periodo de tiempo prolongado después de un ciclo de dosificación. Se determinó el efecto de las dos formulaciones a diversas dosificaciones en el peso corporal de los ratones y se muestra en la Figura 6. Para ambas formulaciones, fue eficaz una dosis de 10 mg/kg/día causando a la vez la mínima pérdida de peso.

Se calculó una medida matemática de cada dosis que determinó la respuesta a fármaco en el retardo de la velocidad de crecimiento tumoral hasta un tamaño de 750 mg en PNT2254 y PNT2253 medicados frente a tumores no medicados de control (Tablas 3 y 4).

Tabla 3. Actividad Antitumoral de PNT2254 en Ratones SCID que Portan WSU-DLCL₂

Agente	Nº de Animales	T/C (%)	T-C	Log ₁₀ de muerte global
Control de PBS diario durante 5 días	7	100	0,0	0,0
PNT2254 0,3 mg/kg diario durante 5 días	7	100	0,0	0,0
PNT2254 3 mg/kg diario durante 5 días	7	75	3	0,45
PNT2254 10 mg/kg diario durante 5 días	7	34	10	1,5
PNT2254 20 mg/kg diario durante 5 días	7	32	10	1,5
PNT2254 30 mg/kg diario durante 2 días	5 (5/7 ratones sobrevivieron)	27	11	1,65

Tabla 4. Actividad Antitumoral de PNT2253 en Ratones SCID que Portan WSU-DLCL₂

Agente	Nº de Animales	T/C (%)	T-C	Log ₁₀ de muerte global
Control de PBS diario durante 5 días	8	100	0,0	0,0
PNT2253 0,3 mg/kg diario durante 5 días	8	92	0,0	0,0
PNT2253 3 mg/kg diario durante 5 días	8	90	2	0,3
PNT2253 10 mg/kg diario durante 5 días	8	38	9	1,4
PNT2253 20 mg/kg diario durante 2 días	6 (6/8 ratones sobrevivieron)	28	12	1,8
PNT2253 30 mg/kg diario durante 1 día	8 (8/8 muertos)	--	--	--

5 T y C son la mediana de los tiempos en días para los tumores del grupo de tratamiento (T) y el grupo de control (C) para alcanzar un peso predeterminado (750 mg). T-C es una medida del retardo del crecimiento tumoral y es la diferencia en la mediana de los días hasta 750 mg entre el grupo tratado (T) y el de control (C). Log₁₀ de muerte Global = valor de T-C en días/3,32 X T_d. T_d es el tiempo de duplicación tumoral medio (días) estimado a partir de una representación de crecimiento lineal logarítmica de los tumores de control que crecen en fase exponencial. Cuanto mayor sea el valor de Log₁₀ de muerte Global, más eficaz será el fármaco, y un valor por encima de 2,8 se considera altamente eficaz (Corbett, T. H. y col., "Transplantable Syngeneic Rodent Tumors". Tumor Models in Cancer Research. Ed. Teicher B. A. Totowa, NJ: Humana Press Inc., 2002. 41-71). El volumen y peso se calcularon de acuerdo con la fórmula descrita por Cammisuli, S., y col., Int. J. Cancer, 65, 351-9, 1996.

10 El tratamiento con PNT2253 dio como resultado aumento de la toxicidad en comparación con PNT2254. La dosis más eficaz fue de 10 mg/kg/día tanto para PNT2253 como para PNT2254, y la dosis máxima tolerada es de 20 mg/kg/día para PNT2254 y 10 mg/kg/día para PNT2253.

15 Ejemplo 5. Respuesta de tumores PC-3 a PNT-100

20 Las diferentes formulaciones se ensayaron en un modelo de carcinoma de próstata humano PC-3. Se generaron xenoinjertos por inyección subcutánea de 2 X 10⁶ células PC-3 (ATCC CRL 1435) en ratones desnudos. Se inyectó a los ratones que portaban xenoinjertos de 50-200 mm³ por vía intravenosa 10 mg/kg de PNT-100 (SEC ID N°: 1251) o PNT-100R (SEC ID N°: 1288) en una de las formulaciones B, D o F los días 1, 2 y 5 y 7,5 mg/kg los días 3 y 4. Los

resultados muestran una reducción del crecimiento tumoral con PNT-100, pero no con PNT-100R (Figura 7 y 8). N=5.

Ejemplo 6. Toxicidad en monos

5 La toxicidad de PNT-100 en la fórmula D se exploró en monos *Cynomolgus*. Se trataron dos primates mediante infusión i.v. de dos horas con control de PBS, PNT2254 5 mg/kg, PNT2254 25 mg/kg y se trató un primate con PNT2254 67 mg/kg. Hubo un periodo de "retirado por lavado" de una semana entre cada dosificación. Se recogieron mediciones de análisis de toxicología de enzimas del hígado, activación del complemento y comportamiento y fisiología globales antes y después de cada tratamiento. El fin del estudio era establecer un umbral de dosis tolerada máxima, y asegurar que no hubo una respuesta tóxica *CARPA* a los lípidos PNT2254. *CARPA* es una respuesta tóxica que se sabe históricamente que resulta de una respuesta tóxica a activación de la ruta de complemento *no clásica* que puede provocar hipertensión extrema y muerte. Los primates toleraron y sobrevivieron a todas las dosis y solamente se detectó una activación de complemento *clásica* y no activación del complemento *no clásica* (innata). El análisis de toxicología de enzimas del hígado demostró aumentos moderados de la respuesta de enzimas del hígado a PNT2254.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Pronai

<120> FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS ANFOTÉRICOS

20 <130> 125829/00032

<160> 1479

25 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1249

<211> 2026

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> oligonucleótido sintético

35 <220>

<221> misc feature

<222> (1)..(2026)

<223> Secuencia de ácido nucleico de parte del gen bcl-2 59140256-59138244 (localización en el cromosoma 18, cadena-)

40 <400> 1249

ES 2 419 106 T3

aacatagcaa aagccatctc ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaagg ccaactaagt aaaaattaaa	60
aaaatcataa tttgggtgtgc ttttctggct ttttaaagaa tgttttgatt ttagagtagg	120
aatgagacaa aataaagatg tcaggcaggg cacagtggct catgtctgta atcccagcac	180
tttgggagge tgaggcaggc ggataacgag gtcaggagtt cgagaccagc ctggccagta	240
tggcgaaacc ccgtctctac taaaaataca aaaattagca gagcgtagtg gcgtgcacgt	300
gtaatcccag ctactcagga ggctgaggca gaattgcttg agcctgggag gcagaggttg	360
cagtgagctg agatcgcacc actgcacacc agcctccaag atacaacaga gcaagactct	420
gtctcaaaaa aaaaaaaaaa gtcatagcat atttgacac attgtagtac tcatttgtca	480
tctttcttga cccaataat ccagtgtccc tatatatttg cactcgagcc ctattaagta	540
agccgctgtg cttctagaag acctttttct tttcttgggt ctttgtcaaa gactcttga	600
gataaaaata cacacgtgca acttgtttgt cctcttgtcc ttttttgcta ggggctattc	660
atgctgatta atttaaaact gtctgcttgc gcgtacacac gtctgcgagt gtgaatgtgt	720
atgtgtgtat ctatgtacct catttgagaa agtgcggccca actaggattg gctacgaggc	780
aaaggtggag acctttagga gccacccac ccagcgtta ggacggtggg cctgaaagtt	840
actatatgga agtcctcatc gtgtagcact aaaccagtgt aaaaggtggt agggacagag	900
ggaaaacatt gacttaaact gtcgtaaagc ccttgataaa ccccttcctt ggagcgctga	960
gttctgcatg gcctgggcca cggactaggt gttcaggtgg acacgggagg ggatgocgct	1020

ES 2 419 106 T3

gcgtgtgtag tgcgcggaca cctaggaagc tacttgaaaag taaacaccac gctcggggcg 1080
 tccttagaca ttgcttaaaa cgtgcagagt cacctgtctt cacagcaggg cagcgtgag 1140
 gtccactgc tgggggcggt gggggcggc attggcctgg gtcttcccc ggcgccgag 1200
 cgccggtaac acaacgtgtg tgtgtgtagg cgctgtaca cactctcata cacggctaga 1260
 aaggggccag ggcacacaca cactcccaca tacacggcta gaaaaggcc aggcgagaca 1320
 cacacacaca cacacacaca cacacacact ccacacacac tcacacggcc agaaagggtc 1380
 caggcggttc ccggcgcttt tccagccctt gttttcatgg cgcacctcc cgcagccgc 1440
 cccctcgc actccgtcgt ccgcccggcc cggcccgctg cggttcccc ggagcccca 1500
 ccccgtcgc gacccagcg accaccaagt ccgcacgcgg cctgccgcag gcctgagcag 1560
 aaggccccgc gcacacccac cgcgcgcgg ccgcgcggga ggctgtgcc gcccgccca 1620
 cccactggcc gggccccgc ggcgcagcgg agcggggcgg tggccggccc ggacgcgcc 1680
 tccccggcc cggccccgc cgcctgtgc ccccgcggg acgcgccact ccggggcctg 1740
 ccgcggcgc ttaaccgg gccagggagc gggcgggagg gggcggtcgg gtggtcaga 1800
 ggagggtct ttctttctt ttttttgaa tgaaccgtgt gacgttacgc acaggaaacc 1860
 ggtcgggctg tgcagagaat gaagtaagag gacaggcacc acagccccgc tcccgcgcc 1920
 ttctccgc gcccgccct ccgcgcgcc tgcccgcccg ccgcgcgcgc tcccgcgcc 1980
 cgtctccgt ggccccgc cgtgcgcc gcgcgcctg ccagcg 2026

5 <210> 1250
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> modified_base
 <222> (3)..(3)
 <223> nucleótido c o C metilado

20 <220>
 <221> modified_base
 <222> (7)..(7)
 <223> nucleótido c o C metilado

25 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> nucleótido c o C metilado

30 <220>
 <221> modified_base
 <222> (17)..(17)
 <223> nucleótido c o C metilado

<220>
 <221> modified_base

ES 2 419 106 T3

<222> (21)..(21)
<223> nucleótido c o C metilado

5 <400> 1250
cacgcacgcg catccccgcc cgtg 24

10 <210> 1251
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> oligonucleótido sintético

15 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> 59139245-59139268 (localización en el cromosoma 18)

20 <400> 1251
cacgcacgcg catccccgcc cgtg 24

REIVINDICACIONES

1. Una mezcla que comprende un oligonucleótido de ADN_i de SEC ID N^o: 1251 y un liposoma anfótero, en la que el liposoma comprende:
- 5 una mezcla de componentes lipídicos con propiedades anfóteras en la que la mezcla de componentes lipídicos comprende componentes aniónicos y catiónicos, en la que al menos uno de dichos componentes son lípidos neutros y sensibles al pH, en la que los lípidos neutros comprenden fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas o esteroides y la mezcla contiene del 5 al 95 % molar de lípidos cargados y del 5 al 95 % de lípidos neutros.
- 10 2. La mezcla de la reivindicación 1 en la que la mezcla contiene del 20 al 80 % molar de lípidos cargados y del 20 al 80 % de lípidos neutros.
3. La mezcla de la reivindicación 1 en la que la mezcla contiene del 30 al 70 % molar de lípidos cargados y del 30 al 70 % de lípidos neutros.
4. La mezcla de la reivindicación 1 en la que la mezcla contiene del 30 al 70 % molar de lípidos cargados y del 30 al 60 % de lípidos neutros.
- 15 5. Una mezcla que comprende un liposoma anfótero y un oligonucleótido de ADN_i que comprende SEC ID N^o: 1251 o 1250 o el complemento del mismo, en la que el liposoma comprende POPC, DOPE, MoChol y CHEMS en la relación molar de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS de 6/24/47/23 o 15/45/20/20.
6. Una composición farmacéutica que comprende la mezcla de las reivindicaciones 1 a 5.
- 20 7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 que comprende un oligonucleótido de ADN_i que comprende SEC ID N^o: 1251 o 1250 y un liposoma que comprende POPC, DOPE, MoChol y CHEMS en la relación molar de POPC/DOPE/MoChol/CHEMS de 6/24/47/23.
8. Un procedimiento *in vitro* para introducir un oligonucleótido de ADN_i en una célula que comprende poner en contacto la célula con la mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la introducción de la composición da como resultado una reducción de la proliferación de la célula, o induce muerte celular.
- 25 9. La mezcla de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o la composición farmacéutica de las reivindicaciones 6 y 7 para su uso en el tratamiento del cáncer.

WSU-DLCL₂ implantado en SC; fármaco IV, días 7-14

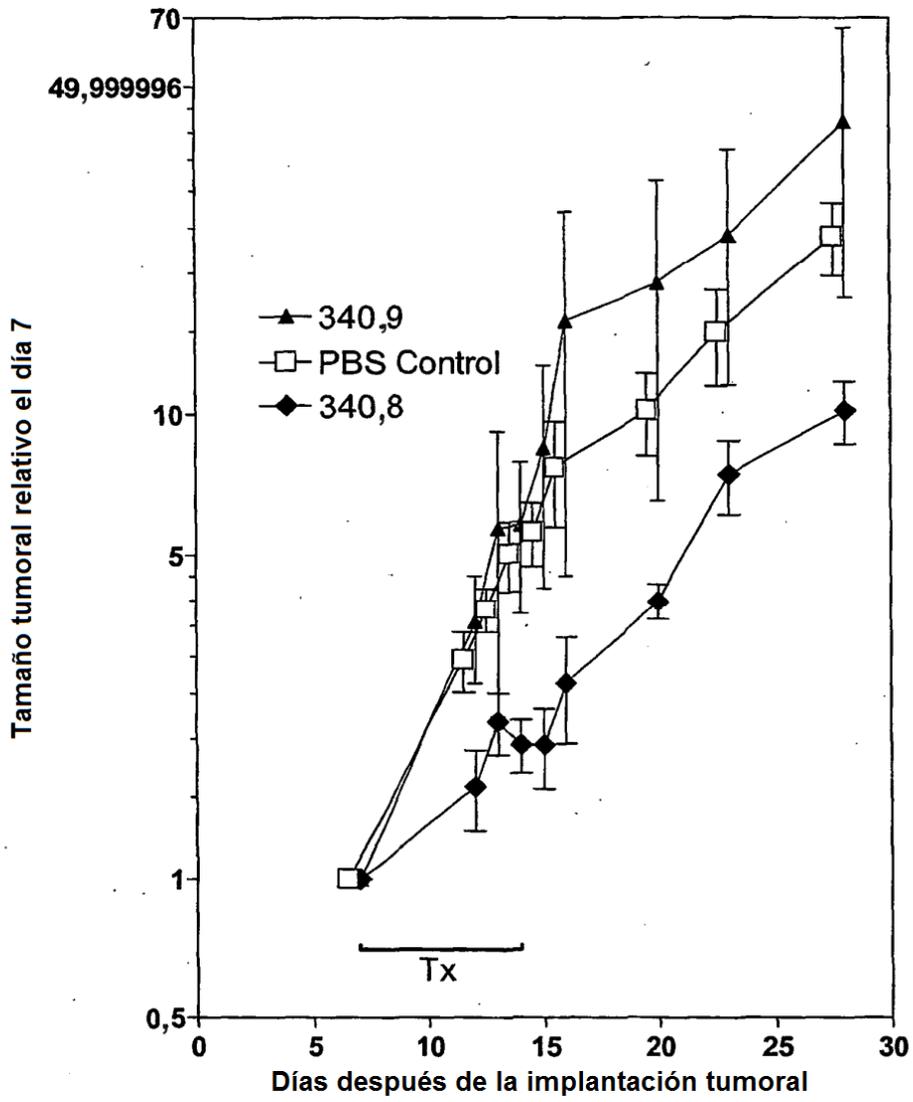


FIGURA 1

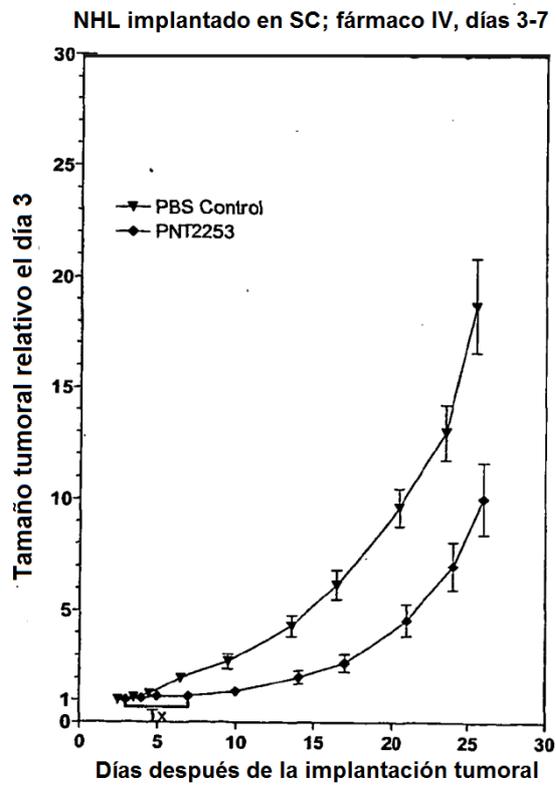
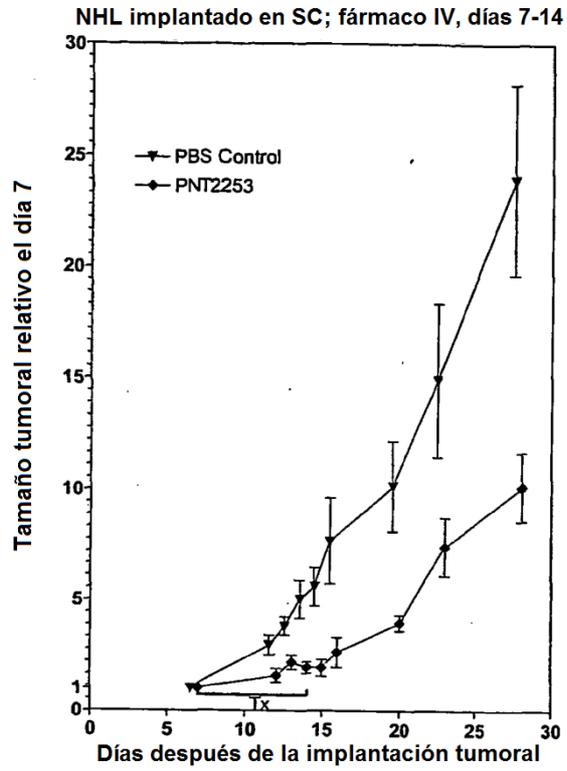


FIGURA 2

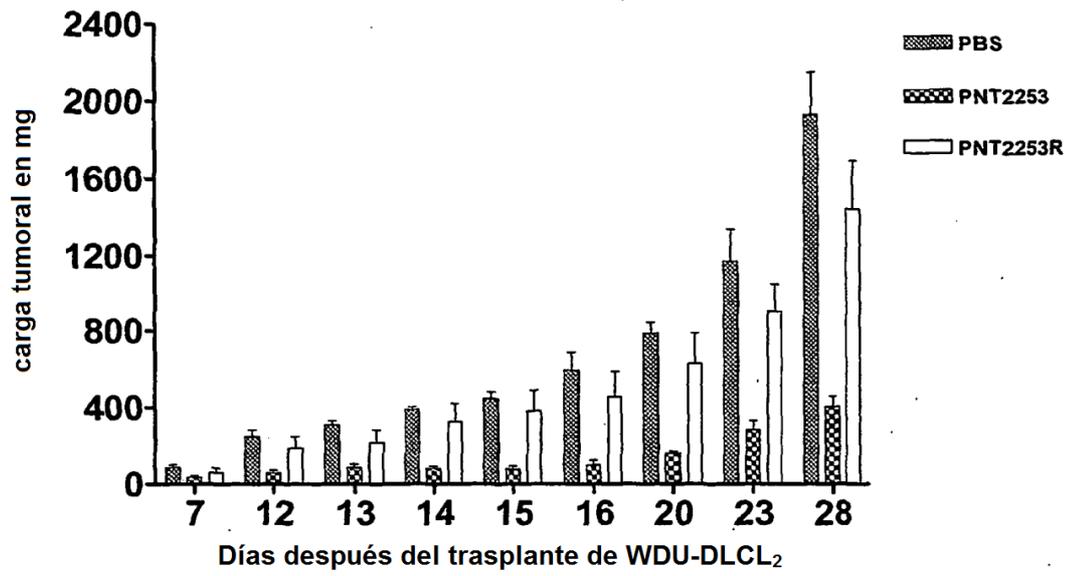


FIGURA 3

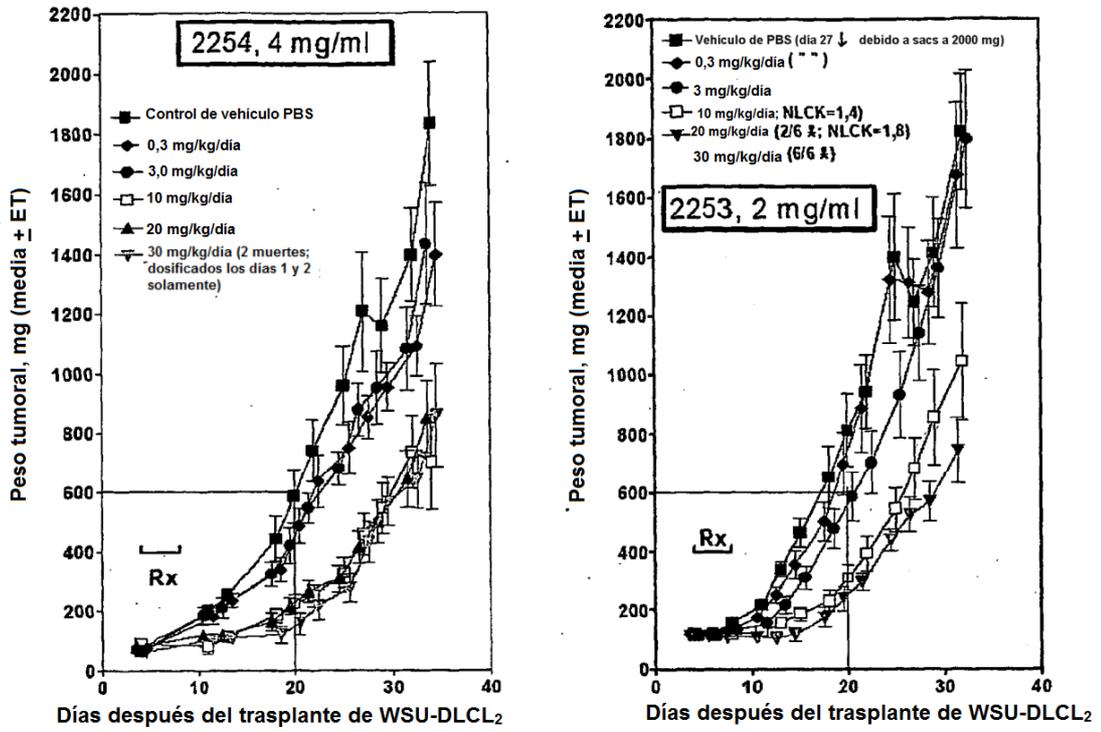


FIGURA 4

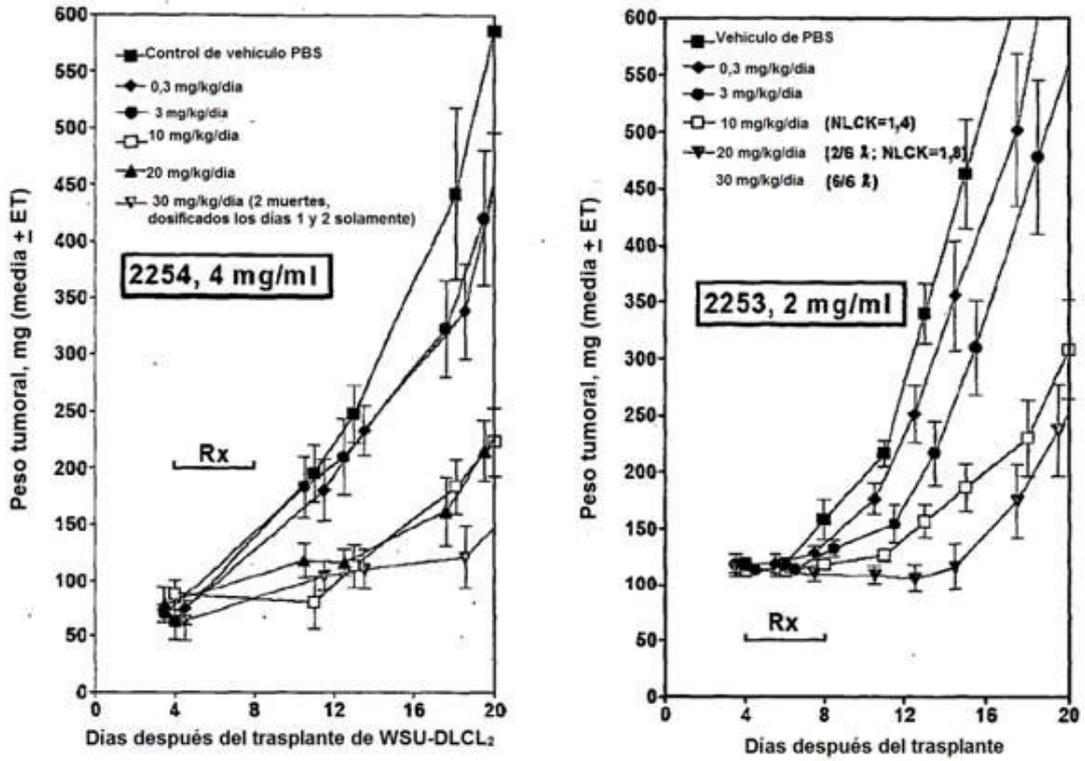


FIGURA 5

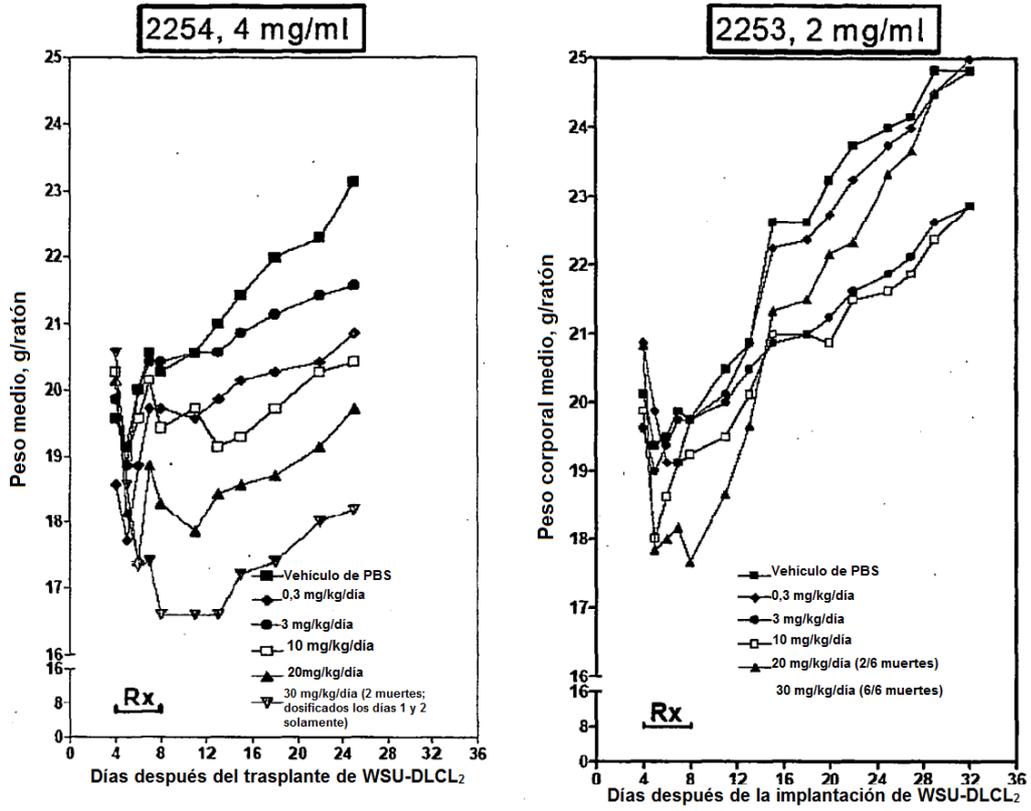


FIGURA 6

PC-3 implantado en SC; fármaco IV, días 1-5

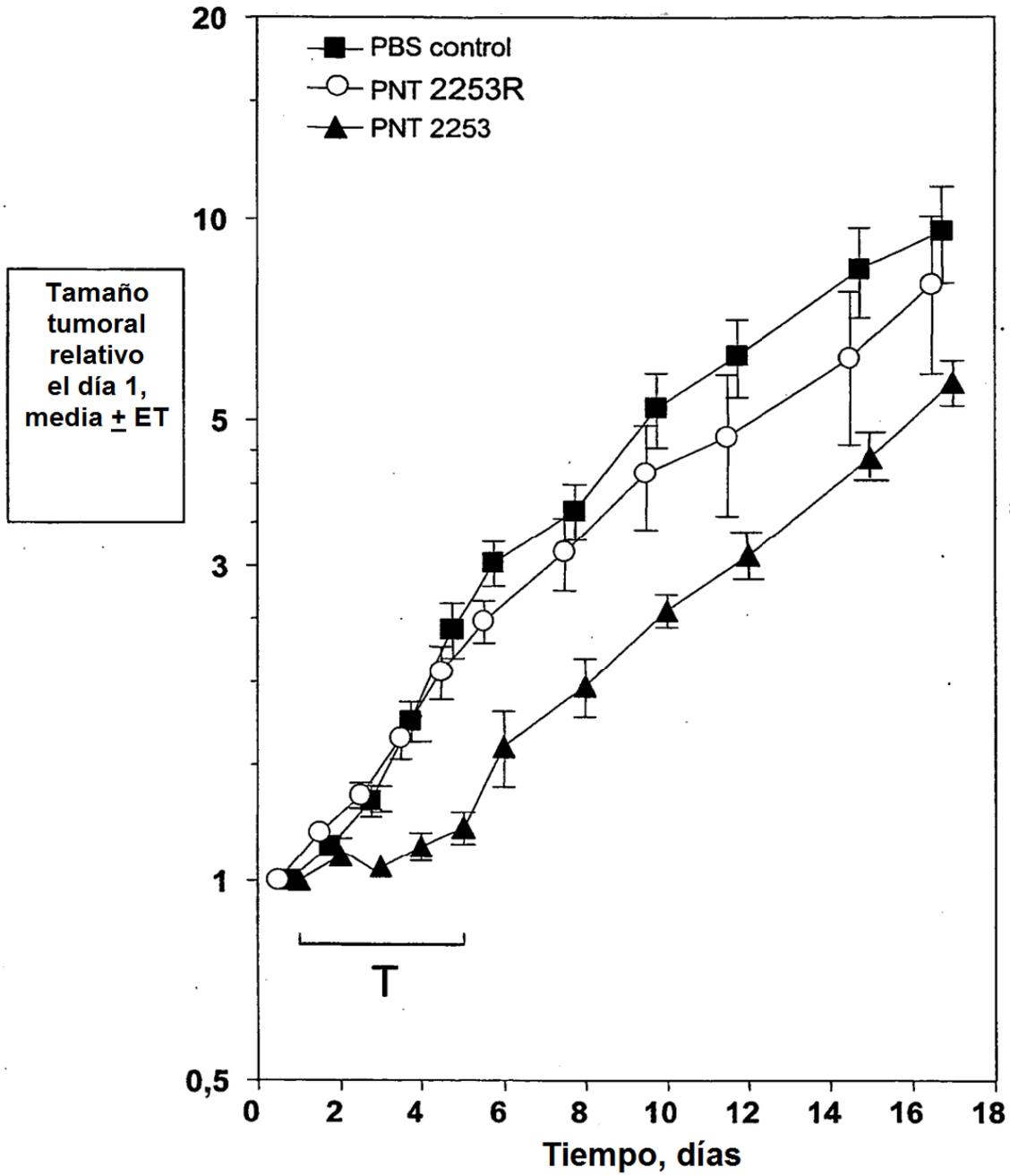


FIGURA 7

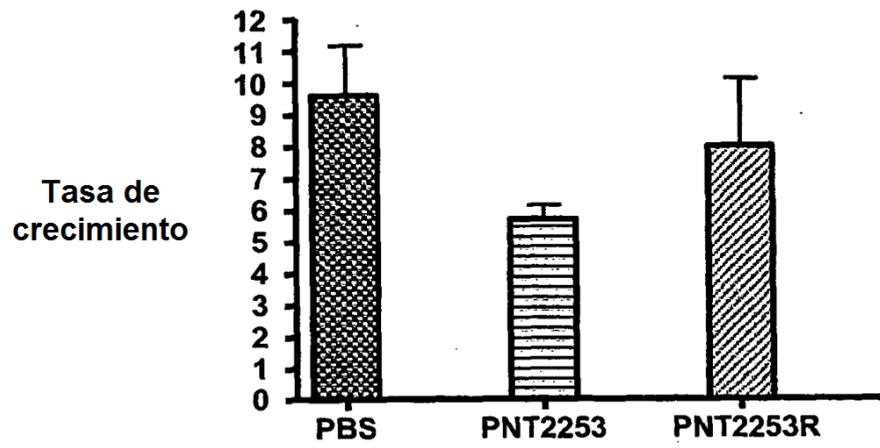


FIGURA 8