

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 471 128**

51 Int. Cl.:

C12N 15/88 (2006.01)

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: **09.11.2009** **E 09760130 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014** **EP 2365797**

54 Título: **Suministro de ARN interferente pequeño**

30 Prioridad:

08.11.2008 EP 08168696

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2014

73 Titular/es:

LIPOXEN TECHNOLOGIES LIMITED (100.0%)
London BioScience Innovation Centre 2 Royal
College Street
London NW1 0NH, GB

72 Inventor/es:

BACON, ANDREW DAVID;
LAING, PETER y
GREGORIADIS, GREGORY

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 471 128 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

Suministro de ARN interferente pequeño

La presente invención se refiere a un nuevo vehículo de suministro para ARN interferentes pequeños (ARNip), específicamente un sistema de suministro liposomal.

Un ARN interferente pequeño (o ARN interferente corto) es un híbrido bicatenario que silencia la expresión de un gen diana a través del proceso de interferencia de ARN. El híbrido es un sustituto en el proceso natural de silenciamiento de genes en un proceso en que el híbrido se desenrolla, una de las cadenas se asocia con una molécula diana de ARNm en un complejo denominado el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que conduce a la destrucción del ARNm. El ARNip tiene el potencial de regular negativamente la expresión de genes *in vivo*.

Un sistema modelo de ensayo de la reducción de genes implica la introducción de un gen reportero exógeno de β -galactosidasa introducido endógenamente en cultivos celulares. Spagnou y otros, (2004) Biochemistry, 43, 13348-13356 describen una transfección *in vitro* de un ARNip dirigido a la β -galactosidasa, mediante la formación de complejos liposomales catiónicos. Los autores describen los complejos en términos comparables a los bien conocidos complejos ADN/lípido, como partículas Lipoplex. Sin embargo Spagnou y otros, explican que los ARNip, al ser pequeñas partículas subnanométricas, pueden no estar protegidos adecuadamente por tales complejos de una degradación enzimática o física. Sin embargo ellos usan técnicas de formulación mediante el uso de una mezcla física de SUV vacíos formados de mezclas de lípidos catiónicos/neutros con ARNip.

Judge, y otros, en Molecular Therapy 2006, 13(3) 494-505, investigan métodos de atrapamiento de ARNip para proteger al sujeto que recibe una terapia con ARNip de los efectos secundarios a partir de respuestas inmunes innatas no deseadas al material de ARNip que tiene tendencia a activar los receptores tipo toll y estimular la producción de interferón tipo I, así como incrementar la captación celular del ARNip. Judge, y otros, muestran que la actividad inmunoestimulante de los ARNip puede reducirse mediante modificaciones a una cadena del híbrido, por ejemplo la modificación química del grupo ribosil 2'-OH mediante metilación o fluoración. Judge, y otros, usan el atrapamiento en liposomas con el objetivo de proteger los ARNip contra una digestión por nucleasas *in vivo*. Ellos usan ARNip específicos para la apolipoproteína B (apoB), la que reduce selectivamente la expresión de apoB en el hígado como se ha demostrado previamente. El ARNip encapsulado se suministró por vía intravenosa a ratones y se demostró que los niveles de apoB en suero, y de esta manera la apoB unida a colesterol, se redujeron, a pesar de los síntomas de toxicidad con los híbridos de ARNip sin modificar ilustrados por pérdida de peso de 1-3 días después de la administración. Los liposomas encapsulantes se formaron de una mezcla de lípidos catiónicos y neutros y pegilados. Judge, y otros, lograron una reducción de la toxicidad mediante la metilación de grupos ribosilo en algunos de los residuos de ribosa de una cadena del híbrido de ARNip.

Hemos descrito previamente el atrapamiento de vacunas génicas en el espacio intravesicular de liposomas, y hemos mostrado que esto logra resultados de protección útiles. Hemos usado liposomas formados de lípidos catiónicos y neutros en combinación, así como liposomas neutros. En el documento WO9810748 mostramos que se logra una mejor respuesta inmune mediante el uso de liposomas catiónicos que de liposomas neutros. Usamos la técnica de atrapamiento liposomal por deshidratación/rehidratación (DRV), descrita originalmente por Kirby y Gregoriadis, y otros, en Bio/technology 1984, 979-984.

Además hemos descrito el co-atrapamiento liposomal de antígeno peptídico y vacuna génica, que codifica un antígeno peptídico que comparte al menos uno y preferentemente varios epítomos con el antígeno peptídico en W02004004758. Se usó el método de DRV, mediante el uso de liposomas catiónicos.

El método DRV implica un proceso en que pequeños liposomas unilamelares (SUV) vacíos que tienen un diámetro promedio de hasta alrededor de 100 nm, se mezclan con una solución acuosa del activo a atrapar, la mezcla se deshidrata, y se rehidrata subsecuentemente. Los liposomas formados subsecuentemente tienen el activo atrapado en el espacio intravesicular de los liposomas que tienen un diámetro promedio mayor que los SUV iniciales. Hemos demostrado que los tamaños de los liposomas pueden controlarse mediante inclusión de azúcar en la mezcla SUV/activo, en el documento WO9965465. Hemos demostrado que esta técnica es de utilidad para el co-atrapamiento de vacuna génica y antígeno peptídico para el antígeno de superficie de la hepatitis B y la HA de la gripe.

A diferencia de la vacunación, donde la exposición a vehículos lipídicos es una experiencia transitoria, tal vez de una vez en la vida, las indicaciones de enfermedades para ARNip incluyen enfermedades crónicas, en donde se esperaría que la dosificación fuera de manera crónica. Se ha demostrado que la administración repetida de lípidos catiónicos podría tener efectos adversos ver más abajo.

Landen, y otros, en Cancer Research 2005, 65(15) 6910-6918, describen la incorporación de ARNip dirigidos a la oncoproteína EphA2 en el interior de vehículos liposomales y mostraron que el producto es altamente eficaz en la reducción *in vivo* de la expresión de EphA2 en un modelo murino de cáncer de ovario. Los liposomas se formaron de dioleoil fosfatidilcolina, que mostró mejora del suministro en 10 veces sobre liposomas formados de un lípido catiónico.

Landen, y *otros*, señalan que un lípido catiónico se capta preferentemente por el hígado y el bazo, lo que puede limitar su eficacia en una terapia sistémica. Ellos concluyen que DOPC equilibra la captación eficiente de ARNip en el interior de un liposoma en preparación, la captación del liposoma en el interior de una célula y la ruptura del liposoma intracelular con liberación del ARNip en el citoplasma. Un trabajo posterior publicado en Halder, y *otros*, Clin. Cancer Res. 2006, 12(16) 4916-4924 describe un atrapamiento liposomal en liposomas similares de ARNip dirigidos a la quinasa de adhesión focal, de nuevo para tratamiento del cáncer de ovario. De nuevo se señala que los liposomas catiónicos tienen problemas de toxicidad al promover inflamación pulmonar, así como que tienen un éxito limitado en el suministro de ARNip, lo cual se cree que es debido a la formación de liposomas excesivamente estables que no se desintegran intracelularmente para liberar el ARNip.

Landen, y *otros*, y Halder, y *otros*, usan una técnica de atrapamiento liposomal que implica la mezcla de lípidos y el activo en presencia de butanol terciario y tween, seguido por liofilización y después rehidratación. No revelan el tamaño de los liposomas. Es importante que se elimine el alcohol pero esto puede ser difícil y es inconveniente. Además la eliminación del tween es deseable pero técnicamente difícil.

El documento Estados Unidos 2007/0172430 (Brito y *otros*) describe preparaciones de liposomas formuladas como polvos secos para suministro mucosal, intranasal, por inhalación o pulmonar que puede incluir uno o más ARNip o precursores dicer-activo de estos, dirigidos a un transcripto implicado en la infección, o la replicación o la producción de un virus de la gripe.

Pons y *otros* (International Journal of Pharmaceutics, 95 (1993) 51-56) describen liposomas obtenidos mediante el uso de variantes del método de inyección de etanol y encapsulación de los fármacos ciprofloxacina y enrofloxacin en ellos.

Batzri y Korn (Biochimica et Biophysica Acta, 298 (1973) 1015-1019) describen la producción de liposomas mediante la inyección de una solución etanólica de fosfolípido en agua. Los liposomas resultantes son indistinguibles de los liposomas obtenidos por sonicación.

El documento WO 2006/113679 (Junta de Regentes del Sistema de la Universidad de Texas) describe la encapsulación de moléculas de ARNip en liposomas para su suministro a una célula. Los liposomas se produjeron al mezclar el fosfolípido con ARNip, butanol y tween-20 mediante un método descrito por Landen y *otros*, anteriormente.

Maitani y *otros* (International Journal of Pharmaceutics 356 (2008) 69-75) describen la producción de liposomas liofilizados que contienen ADN mediante un método que usa una mezcla de lípidos/azúcar. Maitani y *otros* describen el efecto de variar la relación azúcar: lípido y el tipo de azúcar usada, sobre la estabilidad durante el almacenamiento de los liposomas liofilizados que contienen ADN.

El documento Estados Unidos 2008/0063701 (Keller y *otros*) describe la producción y uso de liposomas catiónicos para transferir ARNip al interior de células.

El documento Estados Unidos 2008/0089932 (Panzner y *otros*) describe la preparación de liposomas anfotéricos compuestos de una mezcla de lípidos y métodos para predecir la fusogenicidad de un liposoma anfotérico a un pH dado. Además se describen métodos de encapsulación de ARNip en tales liposomas anfotéricos.

De acuerdo con la invención proporcionamos un nuevo método para producir una composición liposomal de ARNip que comprende ARNip bicatenario atrapado en liposomas que comprende las etapas:

- i) proporcionar una suspensión acuosa de liposomas vacíos que tienen un diámetro promedio en el intervalo de 20 a 200 nm y están formados de componentes formadores de liposomas neutros;
- ii) mezclar en la suspensión ARNip bicatenario y azúcar en una cantidad en el intervalo de 0.1 a 10.0% en peso basado en el peso de los componentes formadores de liposomas para formar una suspensión mixta, y en que la relación en peso del azúcar con respecto a los componentes formadores de liposomas está en el intervalo de 0.75:1 a 7:1; y
- iii) deshidratar la mezcla formada en la etapa ii) para formar una composición deshidratada,

en donde los liposomas formados al rehidratar la composición deshidratada tienen un diámetro promedio en el intervalo de 100 a 500 nm y en donde el ARNip y el azúcar están cada uno atrapados en el espacio intravesicular de los liposomas.

En la invención el ARNip puede modificarse a fin de lograr estabilidad contra una actividad ribonucleasa, o para reducir su toxicidad, por ejemplo como se describe por Judge, y *otros*, mediante modificación de los grupos 2'-hidroxilo de las porciones ribosilo. Sin embargo una ventaja de la presente invención es que el atrapamiento liposomal parece reducir la toxicidad de los ARNip evidenciado al minimizar la pérdida de peso en animales tratados, incluso cuando se usa ARNip no modificado. Por lo tanto preferentemente en la invención el ARNip no se modifica, lo que de esta manera evita etapas adicionales de modificación.

Los liposomas administrados a un animal de manera parenteral es decir mediante inyección, son captados con avidez

por ciertas células. Tales células son en su mayoría las del sistema reticuloendotelial (RES), por ejemplo células del hígado (células de Kupffer), y otros macrófagos en el bazo, la médula ósea, los pulmones, la sangre (por ejemplo monocitos, neutrófilos), etc. La captación por estas células se facilita por opsoninas plasmáticas que cubren los liposomas, y así los vuelve "comibles" por los macrófagos. A esto se le suele hacer referencia como direccionamiento pasivo de liposomas. En el caso del hígado, los liposomas más pequeños que 100 nm de tamaño promedio, pueden alcanzar las células parenquimatosas hepáticas a través de las fenestraciones de 100 nm. Los liposomas administrados por vía subcutánea o intramuscular, en una medida significativa terminan en los ganglios linfáticos de drenaje. Con los liposomas administrados oralmente, usualmente se diseñan para permanecer estables en el intestino. Eventualmente son captados por células M y las placas de Peyer. Creemos que los liposomas producidos por el método de la invención se comportarán de esta manera observada generalmente.

Hemos establecido que los liposomas que contienen azúcar liberan el ARNip en el hígado. El ARNip es adecuado para el tratamiento de una enfermedad donde el hígado es el órgano diana, es decir donde el gen a silenciar se expresa normalmente. En la invención el ARNip puede dirigirse a enfermedades crónicas tales como enfermedad cardiovascular, hepatitis debido a infección viral (por ejemplo hepatitis B, C), cirrosis del hígado causada por infección viral o alcoholismo, infecciones virales crónicas tales como VIH/SIDA y paraperesis espástica tropical/HTLV -I, trastornos de la coagulación de la sangre tales como trombosis, trastornos metabólicos tales como diabetes de tipo I y tipo II, obesidad, artritis reumatoide, osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, enfermedades neoplásicas (cáncer, etc.), osteoporosis, etc.

Si el blanco son células que no tienen afinidad específica por liposomas, los liposomas preparados en la invención pueden recubrirse con ligandos (por ejemplo anticuerpos, péptidos o proteínas desialilados) que se unen a los receptores correspondientes sobre la superficie de la célula y usualmente se internalizan junto con la porción del liposoma. A esto se le suele hacer referencia como direccionamiento activo.

El ARNip está presente adecuadamente en una cantidad en el intervalo de 0.1 a 10.0% en peso basado en el peso de los componentes formadores de liposomas.

El producto del método puede ser una composición en forma seca. Alternativamente puede ser en la forma de una suspensión acuosa en que el ARNip y el azúcar son cada uno atrapados en el espacio intravesicular de los liposomas.

Otras modalidades preferidas de este aspecto de la invención se mencionan en las reivindicaciones.

En la rehidratación del material seco a partir de la etapa iii), se forman liposomas que encapsulan el ARNip. El aumento en el tamaño de los liposomas así obtenidos en comparación con los liposomas obtenidos en la etapa i) es mucho menor cuando se compara con el liposoma en preparaciones que no incluyen un azúcar. Así puede evitarse la necesidad de etapas adicionales de extrusión, microfluidización u homogeneización. Tales etapas adicionales pueden ser nocivas para el ARNip, claramente hemos demostrado previamente que el material de ácido nucleico ADN se daña sustancialmente por microfluidización. A veces pueden desearse etapas adicionales de reducción del tamaño.

Una modalidad preferida de la presente invención incluye la etapa de rehidratación del producto de la etapa iii).

Así este método da lugar a la posibilidad de obtener pequeñas vesículas o liposomas altamente cargados, que pueden ser particularmente útiles en la formación de composiciones farmacéuticas.

Sin embargo es adecuado particularmente para la producción de pequeños liposomas para uso farmacéutico. Para este propósito, los liposomas obtenidos en la etapa i) son vesículas unilamelares adecuadamente pequeñas con un tamaño promedio, por ejemplo en el intervalo a partir de 25 nm a 90 nm, preferentemente en el intervalo a partir de 50 a 90 nm y convenientemente a partir de 70 a 90 nm. Los liposomas obtenidos finalmente a partir del proceso de la invención todavía serán pequeños, con un tamaño promedio de menos de 500 nm, usualmente a partir de 100 a 200 nm.

Los liposomas tienen preferentemente un índice de polidispersión bajo, esto es que tienen tamaños relativamente uniformes. El PD debe ser preferentemente al menos 0.2 preferentemente al menos 0.5. Los inventores creen que la uniformidad de tamaño, así como el tamaño relativamente pequeño del producto, los liposomas rehidratados les permite tener una larga vida media en la circulación y además ser suministrados a los órganos diana. El tamaño permite el paso transcapilar. Ellos pueden, por ejemplo alcanzar los ganglios linfáticos o el tejido inflamado, donde pueden incorporarse dentro de las células y liberar el ARNip.

Los liposomas usados en la etapa i) son liposomas vacíos, obtenidos por cualquiera de los métodos convencionales, por ejemplo mediante el uso de un método clásico como se describió anteriormente. Cualquiera de los liposomas que se producen con un tamaño promedio que es demasiado grande para el propósito deseado puede reducirse por ejemplo mediante el uso de técnicas de sonicación, homogeneización, extrusión o microfluidización como se conocen en la materia.

Los lípidos usados en la producción de los liposomas son bien conocidos en la materia. Ellos incluyen, por ejemplo, fosfatidilcolinas (PC), por ejemplo dioleoil PC, dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) o diestearoil fosfatidilcolina (DSPC),

fosfatidil etanolaminas, y/o colesterol (CHOL). La selección de los lípidos dependerá, en cierta medida de la naturaleza del agente activo y la finalidad prevista del liposoma.

El azúcar puede disolverse previamente en agua antes de adicionarse a los liposomas vacíos o puede adicionarse como un sólido a la suspensión.

Los azúcares adecuados para su uso en la etapa ii) incluyen soluciones acuosas de monosacáridos tales como glucosa y fructosa, disacáridos tales como lactosa o sacarosa así como polisacáridos. Un azúcar particularmente preferido para su uso en el método de la invención es un disacárido tal como sacarosa o lactosa o un monosacárido tal como glucosa. Particularmente, el azúcar es sacarosa.

De manera adecuada la cantidad de azúcar usada en la etapa ii) es tal que la relación de masas de azúcar con respecto a lípidos está en el intervalo a partir de 0.75:1 a 7:1, preferentemente 0.9:1 a 5:1, por ejemplo la relación puede ser 1:1 a 6:1 p/p, de manera adecuada a partir de 1:1 a 5:1 p/p. Se ha encontrado que mientras mayor es la cantidad de azúcar presente, menor es el aumento en el tamaño de los liposomas obtenidos tras la rehidratación, en comparación con los obtenidos en la etapa i). Sin embargo, el grado de atrapamiento del reactivo puede ser menor. Así la selección precisa de las relaciones usadas dependerá del uso final requerido, con un equilibrio determinado entre el grado de atrapamiento para un contenido dado de lípidos y el tamaño del liposoma. La diferencia que esto produce en la formación de los liposomas varía en cierta medida, en dependencia del reactivo particular empleado como se discute más abajo. Adecuadamente, la cantidad de azúcar presente es menor que 10% p/v de la composición.

Además se ha encontrado que al aumentar el volumen de la solución de azúcar usada en el proceso, con reducción de la concentración de la solución de azúcar, puede incrementar el atrapamiento. Las concentraciones adecuadas de soluciones de azúcar son a partir de 20 a 200 mM, preferentemente a partir de 30 a 150 mM.

Adicionalmente, se ha encontrado que si la rehidratación subsecuente se efectúa a temperaturas elevadas, por ejemplo a partir de 30 a 80°C, particularmente a partir de 40 a 65°C y especialmente a aproximadamente 60°C, los valores de atrapamiento pueden aumentar. Se ha encontrado que esto es eficaz con liposomas que comprenden PC y CHOL, que usualmente se formarían a temperatura ambiente. Puede haber cierto aumento de tamaño en comparación con los liposomas iniciales cuando se usan temperaturas elevadas en esta forma, y por lo tanto, esto debe tenerse en cuenta en la selección de las condiciones particulares usadas para producir liposomas en un caso particular.

La selección de las condiciones que darán liposomas del tamaño y carga deseados, que incluyen la relación de masas azúcar: lípido, la selección de lípido, la concentración de la solución de azúcar usada, la cantidad de ARNip incluida en la solución, y la temperatura de rehidratación, pueden determinarse mediante el uso de métodos rutinarios.

La etapa de secado iii) anterior puede llevarse a cabo mediante el uso de métodos convencionales, por ejemplo mediante liofilización, secado por aspersión, cristalización flash, secado por corriente de aire (por ejemplo en un lecho fluidizado), secado al vacío, secado en horno o cualquier otro método conocido en la materia. Aunque las propiedades mecánicas de los productos de estos dos procesos pueden ser diferentes, con el producto de un proceso de secado por aspersión que es un polvo discreto y con frecuencia autodispersable, y con la liofilización que produce una pastilla sólida, las propiedades de los liposomas en la rehidratación en términos de su estabilidad y atrapamiento son similares en términos generales.

Para muchas aplicaciones, que incluyen la producción de composiciones farmacéuticas, puede ser preferible el secado por aspersión para la etapa iii) como resultado de la idoneidad de las propiedades mecánicas del producto para un procesamiento adicional.

El producto de la liofilización comprende un bloque de pastilla porosa que tiene propiedades mecánicas relativamente pobres. El uso de la molienda por chorro de la pastilla para lograr mejores propiedades puede efectuarse, pero puede ocurrir daño en este paso adicional.

El secado por aspersión puede lograr un producto seco con buenas propiedades mecánicas que puede suministrarse por inhalación, o reconstituirse en agua y administrarse por vía parenteral.

La etapa de rehidratación subsecuente, etapa iv) puede llevarse a cabo durante el proceso de fabricación o alternativamente, la composición puede suministrarse en el estado seco y rehidratarse en el sitio de uso previsto, por ejemplo en el hospital o farmacia donde un producto farmacéutico encapsulado se administrará a pacientes.

En consecuencia, una modalidad de la invención es un polvo obtenible por el método de la invención.

Los liposomas liofilizados y rehidratados obtenidos tienen una buena estabilidad que resulta en una larga vida en estante de los productos.

El proceso de la invención permite altos rendimientos y niveles de atrapamiento (es decir altas cantidades de ARNip basado en los componentes formadores de liposomas), que es altamente ventajoso cuando el producto es para usarse

en tratamientos repetidos.

Los productos de liposomas obtenidos mediante el uso del método descrito anteriormente pueden formularse como composiciones farmacéuticas, por ejemplo al combinarlos con portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Las formulaciones pueden ser adecuadas para aplicación parenteral, particularmente intravenosa, o tópica, por ejemplo a la piel o a las superficies mucosas. Una composición útil particular de la invención es una composición que es adecuada para aplicación por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular.

Las composiciones se formulan generalmente de manera que sean adecuadas para la administración por vía intravenosa, aunque pueden usarse además otras técnicas tal como la intramuscular o subcutánea o por vía oral o intravítrea. En dependencia de la enfermedad a tratar, las composiciones pueden administrarse diariamente, varias veces al día, o menos frecuentemente, por ejemplo semanalmente o por infusión durante un período de n.

La presente invención proporciona liposomas formados de ingredientes que son de origen natural en el hombre y consecuentemente de baja toxicidad general. Los liposomas suministran exitosamente sus contenidos en el blanco deseado, lo que se cree que es a través de un buen control del tamaño lo que permite el suministro de la circulación a los órganos diana (donde) sin permitir que el ARNip de lugar a respuestas de citoquinas.

La invención se describirá ahora particularmente en forma de ejemplos con referencia al ejemplo acompañante, los resultados de los cuales se ilustran en los dibujos acompañantes.

En los dibujos:

Las Figuras 1a y b muestran algunos resultados del Ejemplo 1;

La Figura 2 muestra resultados adicionales del Ejemplo 1;

La Figura 3 muestra resultados adicionales del Ejemplo 1; y

La Figura 4 muestra un gel de referencia que indica la electroforesis de LDL murina mediante el uso del kit para la cuantificación de colesterol usado en el Ejemplo 1.

Ejemplo 1 Demostración de una formulación liposomal de ARNip eficaz, en ratones, después de dosificación intravenosa de ARNip dentro de liposomas.

Detalles experimentales:-

A través de los detalles experimentales descritos donde estaba presente el componente basado en ARN todos los demás componentes estaban libres de ribonucleasa.

El(Los) producto(s) del híbrido de ARNip (fármaco) se formaron por hibridación de los siguientes oligonucleótidos (gel purificado (95-99% de pureza), desalado) (Tabla 1):-

Tabla 1 Detalles de oligonucleótidos e híbridos:-

Número de Oligo	Secuencia (5'-3')	Producto híbrido
1	GUCAUCACACUGAAUACCAAU	Híbrido ID1
2	*AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC	
3	GUGAUCAGACUCAAUACGAAU	Híbrido ID2
4	*AUUCGUAUUGAGUCUGAUCACAC	
* asteriscos representan 5' fosfatos		

Después de la hibridación los híbridos se almacenaron a <-40°C hasta su uso.

Los liposomas SUV con un tamaño promedio de 83.1 nm $\pm$ 11.9 (desviación estándar) con un índice de polidispersión = 0.297 $\pm$ 0.071 (desviación estándar), filtrados de manera estéril por 0.22 μ m, compuestos de fosfatidilcolina de huevo (Lipoid, 99% PC) se prepararon en H2O por emulsificación de la masa de lípidos seguido de homogeneización a alta presión (40,000 psi) a temperatura ambiente con una purga continua con nitrógeno. La formulación de liposomas se preparó, en hielo, al mezclar los liposomas SUV con el híbrido de ARNip ID1 seguido de la adición de sacarosa en seco. La relación de masas del híbrido de ARNip: liposoma SUV: componentes de sacarosa fue de 1: 500: 500. Después de la solubilización de la sacarosa la formulación se liofilizó, igual para los híbridos nativos ID1 e ID2.

Se inyectaron grupos de 4 ratones por vía intravenosa, diariamente durante un total de 3 días (así un total de 3 dosis) a través de la vena lateral de la cola con: - a) híbrido de ARNip ID1 liposomal rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección, b) híbrido de ARNip ID1, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección, y c) híbrido de ARNip ID2, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección. La masa de híbrido administrada, idéntica para ID 1 e ID2, fue de 100 μ g por dosis y así 300 μ g en total (3 dosis). La cantidad total de PC usada en la preparación para

los 4 ratones. Así, las cantidades fueron 225 mg de PC (como liposomas SUV antes de la liofilización), 225 mg de sacarosa y 450 microgramos del híbrido ID1. El volumen final de la preparación rehidratada fue 1.125 ml a partir del que se usaron 0.25 ml para dosificar cada ratón.

- 5 El tamaño de los liposomas después de la etapa de rehidratación se determinó mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS, además conocida como Dispersión Dinámica de Luz (DLS)) a 25°C mediante el uso de un Malvern Nano ZS (Malvern Instruments Reino Unido, modelo ZEN3600), equipado con un láser de 633 He-Ne de 4 mW. Se obtuvieron valores del diámetro de partículas promedio Z y distribución del tamaño (índice de polidispersión).
- 10 La eficacia de atrapamiento de híbrido de ARNip se determinó mediante ultracentrifugación (200,000 g, 1 hora) de la formulación liposomal rehidratada en amortiguador de lavado, que se repite dos veces (cada vez con 7 m/amortiguador de lavado), seguido de la cuantificación de ARNip en el amortiguador de lavado después de concentrar por liofilización y rehidratar en aproximadamente 2% del volumen original de agua mediante espectrofotometría UV (absorción a 260 y 280 nm, longitud del recorrido de 1 cm, modelo del espectrofotómetro: - Hitachi U- 2800A). Una curva estándar de espectrofotometría UV (absorción a 260 y 280 nm) del híbrido nativo ID1 se usó para cuantificar el ARNip en el amortiguador de lavado.

- 15 Las muestras de suero se obtuvieron a partir de todos los ratones; el día antes de la dosificación intravenosa (día 0), después de la segunda dosis (día 3), dos días después de la tercera dosis (día 5) y finalmente cuatro días después de la tercera dosis (última) (día 7). Los pesos corporales de todos los ratones se registraron los días 0, 3, 7, 10, y 14 después de administrar la primera dosis.

- 20 Las muestras de suero de ratón así obtenidas se almacenaron refrigeradas, en hielo, hasta el ensayo para LDL / HDL colesterol por electroforesis en geles de agarosa mediante el uso de un sistema HYDRASYS Sebia (Sebia Reino Unido, River Court, The Park Meadows Negocios Blackwater, Camberley, GU17 9AB), mediante la utilización del kit HYDRAGEL 7 HDL/LDL Chol Direct. Brevemente, los kits HYDRAGEL 7 HDL/LDL Chol Direct están destinados a la cuantificación de colesterol transportado por las diferentes fracciones de lipoproteínas separadas en electroforesis en gel de agarosa en el HYDRASYS. Los geles se tiñeron específicamente para la presencia de colesterol mediante el uso de la colesterol esterasa en una reacción cromogénica. La integración de la densidad óptica obtenida a partir del barrido densitométrico de geles de agarosa después de la tinción enzimática, específica para colesterol, permite la cuantificación directa y simultánea de las fracciones LDL y HDL.

Resultados:-

- 25 La distribución del tamaño de partícula por PCS de la composición liposomal rehidratada del híbrido de ARNip ID1 fue, calculado a partir del análisis de las muestras por triplicado, un promedio de 186.1 nm ± 17.94 (desviación estándar) con un índice de polidispersión = 0.665 ± 0.123 (desviación estándar).

- 30 El % de atrapamiento de ARNip se calculó como 55.2 %, mediante el uso del siguiente cálculo (Cálculo 1):-

$$= \frac{\text{\% de atrapamiento de ARNip} \times (\text{híbrido de ARNip total} - \text{híbrido de ARNip en el amortiguador de lavado de la ultracentrifugación})}{\text{híbrido de ARNip total}} \times 100$$

- 35 Los valores absolutos de absorbancia UV del híbrido de ARNip recuperado en el amortiguador de lavado de la ultracentrifugación fueron: - 1.120 Abs a 260 nm (longitud del recorrido 1 cm) y 0.558 a 280 nm (longitud del recorrido 1 cm).

- 40 La Figura 1a) muestra los barridos densitométricos de los geles de agarosa a partir de los análisis de muestras de suero de los ratones dosificados con: - a) híbrido de ARNip ID1 liposomal rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección. Las muestras de los sueros (cuatro) a partir de cada día de muestreo de sangre se aplicaron en el origen (marcados por: - | |) y se separaron mediante electroforesis (la migración es de la parte inferior de la página hacia la superior). Cada carril consiste en el perfil de una muestra de suero de un ratón individual.

- 45 La Figura 1b) muestra los barridos de densitometría de los geles de agarosa a partir del análisis de muestras de sueros de los ratones dosificados con: - b) híbrido de ARNip ID1 rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección. Las muestras de sueros (cuatro) de cada día de muestreo de sangre se aplicaron en el origen (marcado por: - | |) y se separaron mediante electroforesis (la migración es de la parte inferior de la página hacia la superior). Cada carril consiste en el perfil de una muestra de suero de un ratón individual.

- 50 La Figura 2) muestra los barridos de densitometría de los geles de agarosa a partir del análisis de muestras de sueros de los ratones dosificados con: - c) híbrido de ARNip ID2 rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección. Las muestras de sueros (cuatro) de cada día de muestreo de sangre se aplicaron en el origen (marcado por: - | |) y se separaron mediante electroforesis (la migración es de la parte inferior de la página hacia la superior). Cada carril consiste en el perfil de una muestra de suero de un ratón individual.

La Figura 3) muestra los % de cambios de peso corporal calculados (en comparación con el peso corporal del día 0 (día de la primera dosis)) de ratones individuales como un promedio (barras) y desviación estándar (barras de error) con referencia al grupo de dosificación (barra en blanco  a partir de ratones dosificados con a) híbrido de ARNip ID1 liposomal, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección, barra en negro  a partir de ratones dosificados con b) híbrido de ARNip ID1, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección y barra rayada  a partir de ratones dosificados con c) híbrido de ARNip ID2 rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección).

Comentarios:-

La composición liposomal después de la rehidratación eran liposomas pequeños en naturaleza de < 200 nm, de manera tal que sería de esperar que más de 50% de la masa de dosis pasaría a través de un filtro de 0.2 µm. Adicionalmente más del 50% (55.2%) del híbrido de ARNip (ID1) se asoció con las partículas liposomales, de manera que no se recuperó por ultracentrifugación en un amortiguador de lavado. El ARNip recuperado a partir del amortiguador de lavado de la ultracentrifugación tuvo una UV 260nm / UV 280 nm de 2.00 (= 1.120 Abs / 0.558 Abs), indicativo de una alta pureza del ARNip.

Además, ambos híbridos de ARNip se describen en Judge, y otros, *op. cit.* Además, el híbrido de ARNip ID 1 se describe en la solicitud de patente de los Estados Unidos 20060105976:-

Agentes ARNi ilustrativos dirigidos a ApoB					
Sec. con núm. de ident.	Secuencia de la cadena con sentido ^a	Sec. con núm. de ident.	Secuencia de la cadena antisentido ^a	Descriptor del híbrido	Número del agente
97	gucaucacacugaauaccaau	98	auugguauucagugugaugacac	AL-DUP 5048	11

En esa especificación la actividad del híbrido AL-DUP 5048 (híbrido de ARNip ID 1, este ejemplo) se confirma en un ensayo mediante el uso de células NmuLi (hígado murino normal, Número en ATCC: CRL-1638), donde reduce los niveles de ARNm de ApoB murina 72. +/-9%, y la expresión de la proteína ApoB.

El híbrido de ARNip ID 2 se describe en US-A-2007218122:-

Error de apareamiento con ApoB (mm) 5'-GUGAUCAGACUCAAUACGAAU-3' (sec. con núm. de ident.: 176) 3'-CACACUAGUCUGAGUUAUGCUUA-5' (sec. con núm. de ident.: 177) y se sabe que no tiene impacto sobre la producción o traducción del ARNm. Judge, y otros, muestran que este ARNbc con error de apareamiento cuando se encapsula en liposomas catiónicos provoca cierta pérdida de peso en ratones, aunque menos que el ARNip ID 1 encapsulado.

Bioquímicamente (*in vivo*) la proteína ApoB forma un complejo con triacilglicerol y ésteres de colesterol empaquetados en una esfera formada por fosfolípidos, más colesterol no esterificado. El complejo LDL es el vehículo principal para el suministro de colesterol a los tejidos del cuerpo a través de la sangre. Un resultado esperado de una expresión reducida de la proteína ApoB sería una disminución en la concentración en sangre de partículas LDL, ya que la ApoB es una proteína esencial en la formación de partículas LDL.

Claramente, Judge, y otros, (2006) Molecular Therapy Vol. 13, Núm. 3, p494 - 505, comentó que: "el silenciamiento funcional de la expresión de apoB se reflejó en reducciones significativas del colesterol sérico que además se correlacionaron con la potencia relativa de la reducción de ARNm y proteínas". En esta ejemplificación nosotros usamos la cuantificación de partículas LDL como una medida correlativa de la eficacia del ARNip. Como se ha mencionado anteriormente el híbrido ID 1 tiene el potencial de reducir los niveles de ARNm de ApoB murina y la expresión de la proteína ApoB, mientras que no se esperaba que el híbrido 2 tuviera un efecto sobre ApoB, como se muestra por Judge, y otros.

Los resultados del sistema de cuantificación de colesterol LDL/HDL, (Figuras 1a), 1b) y 2)) muestran la presencia de tres bandas electroforéticamente distintas que contienen colesterol. Estas pueden identificarse como: 1) la banda de lipoproteínas de alta densidad (HDL), localizada más cercana al origen, 2) la banda de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), localizada como la segunda más cercana al origen y 3) la banda de lipoproteínas de baja densidad (LDL), localizada más alejada del origen (ver gel de referencia mostrado en la Figura 4). Algunas otras bandas menores no se identifican; sin embargo sobre la base de la especificidad del kit empleado, puede señalarse que estas contienen colesterol.

Figura 2), los barridos de densitometría de los geles de agarosa de los análisis de muestras de suero a partir de ratones

dosificados con:- c) híbrido de ARNip ID2, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección, no muestran cambios sustanciales en el perfil de distribución de las partículas LDL/HDL en ningún tiempo (días) después de la dosificación. El perfil se mantiene constantemente dominado por las partículas LDL, con sólo una menor parte de colesterol sérico asociado con partículas HDL.

Figura 1b), los barridos de densitometría de los geles de agarosa de los análisis de muestras de sueros a partir de ratones dosificados con:- b) híbrido de ARNip ID1 sin formulación liposomal, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección, no muestran cambios sustanciales en el perfil de distribución de las partículas LDL/HDL en ningún tiempo (días) después de la dosificación. El perfil se mantiene constantemente dominado por partículas LDL, con sólo una menor parte de colesterol sérico asociado con partículas HDL. Como se ha descrito previamente el híbrido ID 1 tiene el potencial de reducir los niveles de ARNm de ApoB murina y la expresión de la proteína ApoB, y así en consecuencia las partículas LDL, pero esta respuesta no se observa en estos experimentos con ARNip desnudo. La comparación de las Figuras 2) y 1b) no parece mostrar ningún cambio sustancial en el perfil de distribución de partículas LDL/HDL en ningún tiempo (días) después de la dosificación de cualquiera de los productos de ARNip (ID 1 e ID2).

Figura1a), los barridos de densitometría de los geles de agarosa de los análisis de muestras de suero a partir de ratones dosificados con:- a) híbrido de ARNip ID1 liposomal, rehidratado a partir del liofilizado, con agua para inyección, muestran cambios sustanciales en el perfil de distribución de las partículas LDL/HDL en cualquier tiempo (días) después de la dosificación. La banda de partículas LDL ya no es visible en el día 3, después de 2 dosis del híbrido de ARNip ID1 liposomal, y comienza a aparecer de nuevo en el día 5. En el día 7, equivalente a 4 días después de la tercera dosis de híbrido de ARNip ID1 liposomal, el perfil de distribución de partículas LDL/HDL no es sustancialmente diferente del perfil del día 0 (antes de la dosificación). Así la respuesta observada es transitoria y la ApoB/LDL regresa a valores normales en el día 7 después de la dosificación en el día 7.

La comparación de las Figuras 1a) y 1b) destaca los cambios sustanciales en el perfil de distribución de partículas LDL / HDL después de la dosificación del producto de ARNip idéntico (ID 1), con (Figura 1a)) y sin (Figura 1b)) composición liposomal. Claramente como se señaló en la ausencia de una composición liposomal el híbrido de ARNip ID 1 parece ineficaz, mientras que en la composición liposomal descrita es claramente eficaz.

Adicionalmente, el examen de los pesos corporales de los ratones después de la dosificación Figura 3) indica que; 1) ambos híbridos de ARNip (ID 1 y 2) en composición no liposomal muestran una tendencia de disminución del peso corporal, 2) el híbrido de ARNip (ID 1) en composición liposomal muestra una tendencia de aumento del peso corporal (este es el patrón normal esperado en ratones no tratados de este grupo de edad (4-6 semanas de edad)), y 3) el perfil de peso después de la dosificación del producto de ARNip idéntico (ID 1), con (Figura 2a)) y sin (Figura 2b)) composición liposomal es estadísticamente diferente (prueba de Mann-Whitney, $P < 0.05$) para todos los días después del día 1.

El peso corporal se usa habitualmente como un indicador de salud, bienestar y como un marcador sustituto de toxicidad, así los híbridos de ARNip (ID 1 y 2) en composición no liposomal parecen nocivos, al inducir pérdida de peso. Mientras la formulación de un híbrido de ARNip (ID 1) con una composición liposomal, elimina este efecto nocivo.

En conclusión, la ejemplificación demuestra una formulación liposomal de ARNip eficaz, en ratones, después de la dosificación intravenosa de ARNip dentro de liposomas con el beneficio adicional de mejorar la seguridad.

Ejemplo 2 - Preparación de Vesículas Multilamelares

La preparación de vesículas multilamelares (MLV), que contienen ARNip se ejemplifica de la siguiente manera. Brevemente, las vesículas unilamelares pequeñas (liposomas SUV), filtradas por 0.2 μm , preparadas con 100% de DMPC (dimiristoil fosfatidilcolina, fórmula empírica: $\text{C}_{36}\text{H}_{72}\text{NO}_8\text{P}$; CAS# 18194-24-6) en solución se mezclaron con el material de ARNip (híbrido) también en solución. Después del mezclado de las soluciones precedentes, se adicionó sacarosa como un polvo en masa seca. Después de la solubilización de la masa de sacarosa la solución se congeló a -80°C y subsecuentemente se liofilizó, bajo alto vacío. El producto liposomal final de MLV que contiene el ARNip, se formó por rehidratación del material liofilizado con agua similar al método de DRV (vesícula seca rehidratada) descrito en el Ejemplo 1. La composición de masa siguiente se preparó como se describe: - composición de masa = F1 Liposoma SUV 5 %, ARNip 0.35% y sacarosa 64.65%, F2 Liposoma SUV 26%, ARNip 0.26% y sacarosa 73.74%.

Las formulaciones liposomales de MLV resultantes rehidratadas F1-F4 (inclusivo) anteriores, se ensayaron en un instrumento de dispersión dinámica de luz (DLS) Malvern Zetasizer Nano (ZS) para producir datos sobre las características del tamaño de partículas y el potencial zeta. Las formulaciones rehidratadas se diluyeron en agua y se ensayaron para las características de tamaño de partícula mediante el uso de una cubeta cuadrada de poliestireno y se ensayaron para determinar el potencial zeta mediante el uso de una celda zeta capilar plegada clara. Todas las mediciones se realizaron mediante el uso de criterios óptimos automáticos según lo determinado por el instrumento. Los siguientes resultados de las características de tamaño de partícula y del potencial zeta de las composiciones respectivas se basaron en muestras duplicadas rehidratadas. Para F1 el tamaño de partícula Zave fue de 503 / 301 nm (duplicado), mientras que el potencial zeta fue -2.55 / -2.76 mV (duplicado). Para F2 el tamaño de partícula Zave fue de 182 / 155nm (duplicado), mientras que el potencial zeta fue 0.49 / -3.67mV (duplicado).

Además las resultantes formulaciones rehidratadas F1 y F2 anteriores de los productos liposomales MLV rehidratados, se analizaron mediante centrifugación diferencial para determinar el material de ARNip asociado con los liposomas. Los liposomas se sedimentan mediante centrifugación y el material de ARNip no asociado a liposomas permanece en el sobrenadante. La validación de la experimentación con ambos componentes individuales y mezclas, había indicado previamente más de 95% de sedimentación de liposomas y menos de 5% de sedimentación de ARNip. La cuantificación de ARNip no asociado en el sobrenadante después de la centrifugación se llevó a cabo de manera fluorométrica. Se asumió que el resto estaba asociado con liposomas. Los siguientes valores de asociación de ARNip como un porcentaje del ARNip total para las composiciones respectivas se basaron en material rehidratado duplicado. Los resultados de % de ARNip asociado a liposomas fueron para F1 51 / 33% (duplicado) y para F3 19 / 16% (duplicado).

El mayor nivel de azúcar reduce el tamaño de los liposomas formados pero parece reducir además el rendimiento de atrapamiento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Lipoxen Technologies Limited Bacon, Andrew D Laing, Peter Gregoriadis, Gregory

<120> Suministro de ARN inteferente pequeño

<130> P39619WO

<140> PCT/EP2009/064848

<141> 2009-11-09

<150> EP 08168696.6

<151> 2008-11-08

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido ribonucleico sintético

<400> 1

gucaucacac ugaauaccaa u 21

<210> 2

<211> 23

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido ribonucleico sintético

<400> 2

auugguauuc agugugauga cac 23

<210> 3

<211> 21

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de ácido ribonucleico sintético

<400> 3

gugaucagac ucaauacgaa u 21

<210> 4

<211> 23

<212> ARN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia de ácido ribonucleico sintético

<400> 4

auucguauug agucugauca cac 23

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para preparar una composición de ARNip liposomal que comprende las etapas de:
 - i) proporcionar una suspensión acuosa de liposomas vacíos que tienen un diámetro promedio en el intervalo de 20 a 200 nm y están formados de componentes neutros formadores de liposomas;
 - 10 ii) mezclar en la suspensión ARNip bicationario y azúcar en una cantidad en el intervalo de 0.1 a 10.0% en peso basado en el peso de los componentes formadores de liposomas para formar una suspensión mixta, y en que la relación en peso de azúcar con respecto a los componentes formadores de liposomas está en el intervalo de 0.75:1 a 7:1; y
 - 15 iii) deshidratar la mezcla formada en la etapa ii) para formar una composición deshidratada,en donde los liposomas formados por rehidratación de la composición deshidratada tienen un diámetro promedio en el intervalo de 100 a 500 nm y en donde el ARNip y el azúcar están cada uno atrapados en el espacio intravesicular de los liposomas.
- 20 2. Un método de acuerdo a la reivindicación 1, en que el azúcar es un monosacárido o un disacárido.
- 20 3. Un método de acuerdo a la reivindicación 2, en que el azúcar es un disacárido.
- 25 4. Un método de acuerdo a la reivindicación 3, en que el azúcar es sacarosa.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que los componentes formadores de liposomas comprenden una fosfatidilcolina y opcionalmente una fosfatidil etanolamina, y/u opcionalmente colesterol.
- 30 6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que la relación en peso del azúcar con respecto a los componentes formadores de liposomas está en el intervalo de 0.9:1 a 5:1.
- 30 7. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que los liposomas vacíos de la etapa i) tienen un diámetro promedio en el intervalo de 25 nm a 90 nm.
- 35 8. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que la etapa iii) es la liofilización.
- 35 9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que la relación en peso del azúcar con respecto a los componentes formadores de liposomas está en el intervalo de 1:1 a 6:1.
- 40 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en que la relación en peso de azúcar con respecto a los componentes formadores de liposomas está en el intervalo de 1:1 a 5:1.
- 40 11. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en que los liposomas vacíos de la etapa i) tienen un diámetro promedio en el intervalo de 50 a 90 nm.
- 45 12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende la etapa adicional de:
 - iv) rehidratar la composición deshidratada para formar una composición liposomal rehidratada, en donde el ARNip y el azúcar están atrapados en el espacio intravesicular de los liposomas.
- 50 13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en que los liposomas de la composición rehidratada tienen un diámetro promedio en el intervalo de 100 a 200 nm.
- 55 14. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, en que la composición rehidratada se somete a microfluidización.
- 55 15. Un polvo que puede obtenerse mediante el método de las reivindicaciones 1-7, o las reivindicaciones 9-11, en donde la deshidratación se lleva a cabo mediante secado por aspersión.
- 60 16. Una suspensión acuosa de liposomas que puede obtenerse mediante el método de las reivindicaciones 1-11, que comprende la etapa adicional de:
 - iv) rehidratar la composición deshidratada para formar una composición liposomal rehidratada, en donde el ARNip y el azúcar están cada uno atrapados en el espacio intravesicular de los liposomas.
- 65 17. Una suspensión acuosa de liposomas, en donde el ARNip y el azúcar están cada uno atrapados en el espacio intravesicular de los liposomas que puede obtenerse mediante el método de las reivindicaciones 12-14.

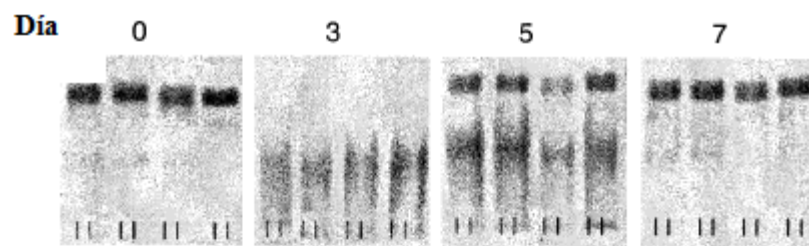


Figura 1a)

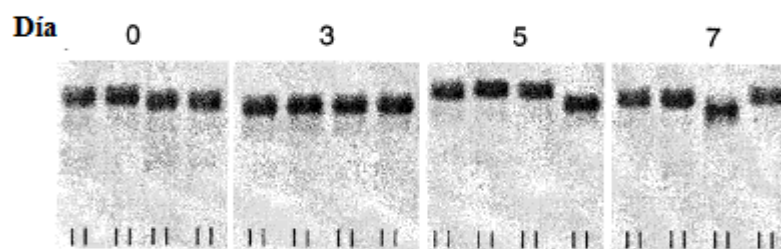


Figura 1b)

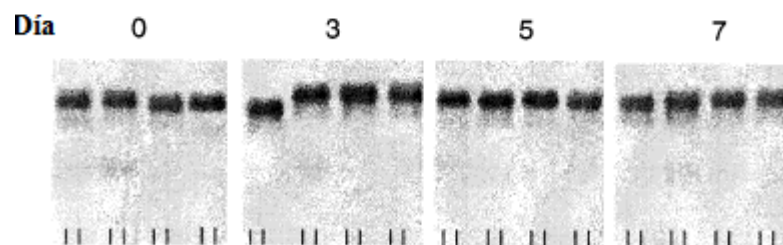


Figura 2)

