

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 475 065**

51 Int. Cl.:

**C07D 345/00** (2006.01)

**C07D 517/00** (2006.01)

**A61K 9/127** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.10.2009 E 09819991 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.03.2014 EP 2350043**

54 Título: **Aminolípidos mejorados y métodos para la administración de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**09.10.2008 US 104212 P**

**09.10.2008 US 104219 P**

**26.06.2009 US 220666 P**

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

**10.07.2014**

73 Titular/es:

**TEKMIRA PHARMACEUTICALS CORPORATION**

**(50.0%)**

**100-8900 Glenlyon Parkway**

**Burnaby, BC V5J 5J8, CA y**

**THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**HOPE, MICHAEL J.;**

**SEMPLE, SEAN C.;**

**CHEN, JIANXIN;**

**MADDEN, THOMAS D.;**

**CULLIS, PIETER R.;**

**CIUFOLINI, MARCO A. y**

**MUI, BARBARA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 475 065 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

Aminolípidos mejorados y métodos para la administración de ácidos nucleicos

Antecedentes

Campo de la técnica

- 5 La presente invención se refiere al campo de la administración de un agente terapéutico utilizando partículas lipídicas. En particular, la presente invención proporciona lípidos catiónicos y partículas lipídicas que comprenden estos lípidos, que son ventajosas para la administración *in vivo* de ácidos nucleicos, así como composiciones de ácidos nucleicos - partículas lipídicas adecuadas para uso terapéutico *in vivo*. Adicionalmente, la presente invención proporciona métodos para la elaboración de estas composiciones, así como se relaciona con métodos para la introducción de ácidos nucleicos en células utilizando estas composiciones, por ejemplo, para el tratamiento de diversas condiciones de enfermedad.

Descripción de la técnica relacionada

- 15 Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, por ejemplo, ARN pequeño de interferencia (ARNpi), micro ARN (miARN), oligonucleótidos antisentido, ribozimas, plásmidos, y ácidos nucleicos de estimulación inmunológica. Estos ácidos nucleicos actúan a través de una variedad de mecanismos. En el caso de ARNpi o miARN, estos ácidos nucleicos pueden subregular los niveles intracelulares de proteínas específicas a través de un proceso denominado ribointerferencia (ARNi). Después de la introducción de ARNpi o miARN en el citoplasma de la célula, estos constructos de ARN bicatenarios pueden enlazarse a una proteína denominada RISC. La cadena sentido del ARNpi o miARN es desplazada del complejo RISC que proporciona una plantilla dentro de RISC que pueden reconocer y enlazar ARNm con una secuencia complementaria a aquella del ARNpi o miARN enlazado. Habiendo enlazado el ARNm complementario, el complejo RISC escinde el ARNm y libera las cadenas escindidas. La ARNi puede proporcionar la subregulación de proteínas específicas centrándose en la destrucción específica del ARNm correspondiente que codifica para la síntesis de proteínas.

- 25 Las aplicaciones terapéuticas de la ARNi son extremadamente amplias, ya que los constructos de ARNpi y miARN se pueden sintetizar con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra una proteína objetivo. Hasta la fecha, los constructos de ARNpi han demostrado la capacidad para subregular específicamente proteínas objetivo tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. Además, los constructos de ARNpi están siendo actualmente evaluados en estudios clínicos.

- 30 Sin embargo, dos problemas que actualmente enfrentan los constructos de ARNpi o miARN son, primero, su susceptibilidad a la digestión por nucleasas en el plasma y, segundo, su limitada capacidad para tener acceso al compartimiento intracelular donde pueden enlazar RISC cuando se administran sistémicamente como el ARNpi o miARN libres. Estos constructos bicatenarios se pueden estabilizar mediante la incorporación de enlazadores de nucleótidos modificados químicamente dentro de la molécula, por ejemplo, grupos fosfotioato. Sin embargo, estas modificaciones químicas proporcionan únicamente una protección limitada de la digestión de nucleasa y pueden disminuir la actividad del constructo. La administración intracelular de ARNpi o miARN se puede ver facilitada mediante el uso de sistemas portadores tales como polímeros, liposomas catiónicos o por modificación química del constructo, por ejemplo, mediante la unión covalente de moléculas de colesterol [referencia]. Sin embargo, se requieren sistemas de administración mejorados para aumentar la potencia de las moléculas de ARNpi y miARN y reducir o eliminar el requisito de la modificación química.

- 40 Los oligonucleótidos antisentido y los ribozimas también pueden inhibir la traducción del ARNm en proteína. En el caso de constructos antisentido, estos ácidos desoxirribonucleicos monocatenarios tienen una secuencia complementaria a la del ARNm de la proteína objetivo y pueden enlazar al ARNm por medio del apareamiento de bases de Watson-Crick. Este enlazamiento o bien impide la traducción del ARNm objetivo y / o desencadena la degradación por la ARNasa H de los transcritos de ARNm. En consecuencia, los oligonucleótidos antisentido tienen un enorme potencial por la especificidad de la acción (es decir, subregulación de una proteína relacionada con una enfermedad específica). Hasta la fecha, estos compuestos han demostrado ser prometedores en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo los modelos de enfermedad inflamatoria, cáncer, y el VIH (revisado en Agrawal, Trends in Biotech. 14: 376 - 387 (1996)). El antisentido también puede afectar la actividad celular por hibridar específicamente con el ADN cromosómico. Evaluaciones clínicas avanzadas con humanos de varios fármacos antisentido están actualmente en curso. Los objetivos de estos medicamentos incluyen los genes bcl2 y de la apolipoproteína B y productos de ARNm.

Ácidos nucleicos inmunoestimuladores incluyen ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos. En el caso de los ácidos desoxirribonucleicos, se ha demostrado que ciertas secuencias o motivos provocan estimulación inmune en mamíferos. Estas secuencias o motivos incluyen el motivo CpG, secuencias ricas en pirimidinas y secuencias

palindrómicas. Se cree que el motivo CpG en ácidos desoxirribonucleicos es específicamente reconocido por un receptor endosomal, el receptor 9 tipo toll (TLR-9), que luego activa tanto la ruta de estimulación inmune adquirida como la innata. También se han reportado ciertas secuencias de ácido ribonucleico estimuladoras del sistema inmune. Se cree que estas secuencias de ARN desencadenan la activación inmune mediante el enlazamiento con los receptores 6 y 7 tipo toll (TLR-6 y TLR-7). Además, también se ha reportado que ARN bicatenario es estimulador del sistema inmune y se cree que se activa a través del enlazamiento con TLR-3.

Un problema bien conocido con el uso de ácidos nucleicos terapéuticos se refiere a la estabilidad del enlace internucleótido fosfodiéster y la susceptibilidad de este enlazador a las nucleasas. La presencia de exonucleasas y endonucleasas en suero trae como resultado la rápida digestión de ácidos nucleicos que poseen enlazadores fosfodiéster y, por lo tanto, los ácidos nucleicos terapéuticos puede tener vidas medias muy cortas en presencia de suero o dentro de las células. (Zelphati, O., et al., *Antisense. Res. Dev.* 3: 323 - 338 (1993); y Thierry, A. R., et al., páginas 147 - 161 en *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Eds. Erickson, RP e Izant, J. G.; Raven Press, Nueva York (1992)). El ácido nucleico terapéutico que está siendo desarrollado actualmente no emplea la química fosfodiéster básica que se encuentra en los ácidos nucleicos naturales, debido a estos y a otros problemas conocidos.

Este problema ha sido superado parcialmente mediante modificaciones químicas que reducen la degradación del suero o intracelular. Se han analizado las modificaciones en el puente fosfodiéster internucleotídico (por ejemplo, usando enlaces fosforotioato, metilfosfonato o fosforamidato), en la base nucleotídica (por ejemplo, 5-propinilpirimidinas), o en el azúcar (por ejemplo, azúcares modificados en la posición 2') (Uhlmann E., et al. *Antisense: Chemical Modifications. Encyclopedia of Cancer*, Vol. X., páginas 64 - 81 Academic Press Inc. (1997)). Se han intentado otros cambios para mejorar la estabilidad usando enlaces de azúcar 2'-5' (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 5.532.130). Se han intentado otros cambios. Sin embargo, ninguna de estas soluciones han demostrado ser enteramente satisfactoria, y los ácidos nucleicos terapéuticos libres *in vivo* todavía tienen sólo una eficacia limitada.

Además, como se señaló anteriormente en relación con ARNpi y miARN, sigue habiendo problemas con la limitada capacidad de los ácidos nucleicos terapéuticos para cruzar las membranas celulares (véase, Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1197: 95 - 1082 (1994)) y en los problemas asociados con la toxicidad sistémica, tales como anafilaxis mediada por el complemento, propiedades coagulantes alteradas, y citopenia (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4: 201 - 206 (1994)).

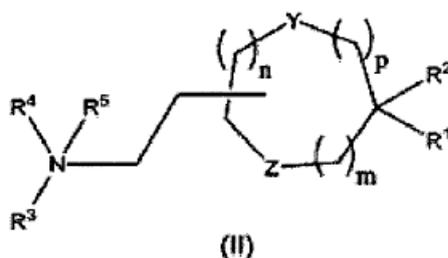
Para tratar de mejorar la eficacia, los investigadores también han empleado sistemas portadores con base lipídica para administrar ácidos nucleicos terapéuticos químicamente modificados o no modificados. En Zelphati, O y Szoka, F. C, J. *Contr. Rel.* 41: 99 - 119 (1996), los autores se refieren a la utilización de liposomas aniónicos (convencionales), liposomas sensibles al pH, inmunoliposomas, liposomas fusogénicos, y agregados lipídicos / antisentido catiónicos. Del mismo modo, se ha administrado sistémicamente ARNpi en liposomas catiónicos, y se ha reportado que estas partículas lipídicas que contienen ácido nucleico proporcionan una mejor regulación de las proteínas objetivo en mamíferos, incluidos los primates no humanos (Zimmermann et al., *Nature* 441: 111 - 114 (2006)). El documento WO 2006/138380 divulga lípidos que contienen amina para uso en la administración de fármacos.

A pesar de este progreso, sigue existiendo la necesidad en el arte por partículas lipídicas que contienen ácido nucleico mejoradas y composiciones que sean adecuadas para uso terapéutico general. Preferiblemente, estas composiciones encapsularían ácidos nucleicos con alta eficiencia, tienen una alta relación fármaco : lípido, protegen el ácido nucleico encapsulado de la degradación y eliminación en suero, son adecuadas para la administración sistémica, y proporcionan el suministro intracelular del ácido nucleico encapsulado. Además, estas partículas lipídicas que contienen ácido nucleico deben ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado, de tal manera que el tratamiento del paciente con una dosis efectiva del ácido nucleico no está asociado con toxicidad y / o riesgo significativo para el paciente. La presente invención proporciona tales composiciones, métodos para la preparación de las composiciones, y métodos para el uso de las composiciones para introducir ácidos nucleicos en las células, incluyendo el tratamiento de enfermedades.

#### Breve resumen

La presente invención proporciona nuevos aminolípidos, así como partículas lipídicas que los contienen. Estas partículas lipídicas pueden comprender además un agente activo y ser utilizadas de acuerdo con métodos relacionados de la invención para suministrar el agente activo a una célula.

En una forma de realización, la presente invención incluye un amino lípido que tiene la siguiente estructura (II):



o sales del mismo, en donde

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son o bien iguales o diferentes y son independientemente alquilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> sustituido, alquenilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido, alquinilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido, o acilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido;

- 5 R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son o bien iguales o diferentes y son independientemente alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alquenilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, o alquinilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se pueden unir para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos escogidos entre nitrógeno y oxígeno;

R<sup>5</sup> está o bien ausente o es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> para proporcionar una amina cuaternaria;

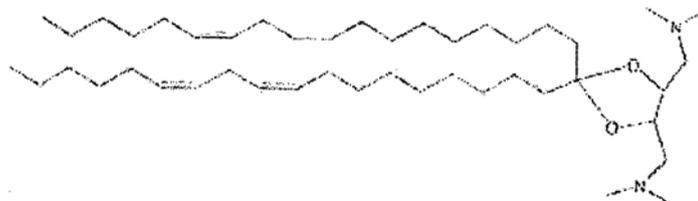
- 10 m, n, y p son o bien iguales o diferentes y son independientemente 0 o 1 con la condición de que m, n, y p no sean simultáneamente 0;

Y y Z son o bien iguales o diferentes e independientemente O, S, o NH.

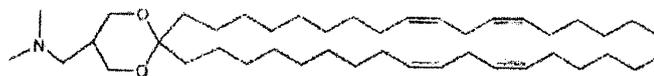
En una forma de realización, el amino lípido tiene la siguiente estructura:

En una forma de realización, el amino lípido tiene una de las siguientes estructuras:

15



o



DLin-K6-DMA.

- 20 En una forma de realización, la presente invención incluye una partícula lipídica que comprende un amino lípido de acuerdo con cualquiera de los anteriores, en donde opcionalmente y preferiblemente, la partícula comprende además un lípido neutro y un lípido capaz de reducir la agregación de partículas; y en donde opcionalmente y preferiblemente además, en donde la partícula lipídica comprende:

(i) DLin-K-C2-DMA;

(ii) un lípido neutro seleccionado de DSPC, POPC, DOPE, y SM;

- 25 (iii) colesterol; y

(iv) un PEG-lípido,

en una relación molar de alrededor de 20-60% de DLin-K-DMA: 5 - 25% de lípido neutro:25 - 55 % de colesterol: 0,5 - 15% de PEG - lípido.

5 En ciertas realizaciones, la partícula lipídica comprende además un agente terapéutico, en el que, opcionalmente y preferiblemente, el agente terapéutico es un ácido nucleico; y en el que opcionalmente y más preferiblemente, el ácido nucleico es un plásmido, o un oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico.

En ciertas realizaciones, el ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste de: un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y una ribozima; opcionalmente, en el que el ácido nucleico es un ARNpi.

10 En una forma de realización, la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende la partícula lipídica de una cualquiera de las anteriores y un excipiente farmacéuticamente aceptable, portador, o diluyente.

15 En una forma de realización, la presente invención proporciona un método *in vitro* de modular la expresión de un polipéptido por una célula, que comprende proporcionar a una célula la partícula lipídica de una cualquiera de las anteriores, en el que, opcionalmente y preferiblemente, el agente terapéutico se selecciona de un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNpi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en el que el ARNpi, microARN, o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se enlaza específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento de los mismos, de tal manera que se reduce la expresión del polipéptido; en el que opcionalmente y más preferiblemente, el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de tal manera que se incrementa la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento de los mismos.

20 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, comprendiendo el método proporcionar al sujeto la composición farmacéutica, en donde el agente terapéutico se selecciona de un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNpi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNpi, microARN, o ARN antisentido comprenden un polinucleótido que se enlaza específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

25 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizado por una menor expresión de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica al polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.

30 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es para uso en un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica para uso como se mencionó anteriormente, se proporciona al paciente en combinación con una vacuna o antígeno.

35 En una forma de realización, la presente invención incluye una vacuna que comprende una partícula lipídica como se mencionó anteriormente y un antígeno asociado con una enfermedad o patógeno.

En ciertas realizaciones, dicho antígeno es un antígeno tumoral.

En ciertas realizaciones, dicho antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, o un antígeno parasitario.

Breve descripción de las diferentes vistas de los dibujos

40 La Figura 1 es un diagrama de un mecanismo de acción propuesto para los efectos destructivos de la membrana de lípidos catiónicos y un diagrama estructural de DLinDMA dividido en dominios del grupo de cabeza, el enlazador y de la cadena hidrocarbonada. En forma aislada, los lípidos catiónicos y los lípidos aniónicos de la membrana endosomal, tales como fosfatidilserina adoptan una forma molecular cilíndrica, que es compatible con el empaquetamiento en una configuración bicapa. Sin embargo, cuando los lípidos catiónicos y aniónicos se mezclan entre sí, se combinan para formar pares iónicos en donde el área de sección transversal del grupo de cabeza combinado es menor que el de la suma de las áreas del grupo de cabeza individual en forma aislada. Por  
45 consiguiente, el par iónico adopta una forma molecular de "cono", que promueve la formación de fases invertidas que no son bicapa tales como la fase hexagonal H<sub>II</sub> ilustrada. Las fases invertidas no soportan la estructura de bicapa y están asociadas con la fusión de la membrana y la ruptura de la membrana (Hafez, I. M., et al., Gene Ther 8, 1188 - 1196 (2001) y Cullis, P. R., et al., Chem Phys Lipids 40, 127 - 144 (1986)).

Las Figuras 2A-B son gráficos que representan la actividad de silenciamiento *in vivo* de partículas lipídicas - ácido nucleico que comprenden diferentes lípidos catiónicos. La Figura 1A representa la actividad de silenciamiento de las formulaciones DLinDAP (▼), DLinDMA (▲), DLin-K-DMA (■) y DLin-K-C2-DMA (●) en el modelo de ratón FVII. Todas las partículas lipídicas - ácido nucleico se prepararon utilizando el método de la vesícula preformada (PFV) y estaban compuestas de lípido catiónico ionizable, DSPC, colesterol y PEG - lípido (40/10/40/10 mol / mol) con una relación de ARNpi FVII con respecto al lípido total de -0,05 (peso / peso). Los puntos de datos se expresan como un porcentaje de los animales de control con PBS y representan la media del grupo (n = 5) ± DE, y se compararon todas las formulaciones en el mismo estudio. La Figura 2B demuestra la influencia de las extensiones del grupo de cabeza sobre la actividad de DLin-K-DMA. DLin-K-DMA (■) tenía grupos metileno adicionales añadidos entre el grupo de cabeza de DMA y el enlazador del anillo cetil para generar DLin-K-C2-DMA (●), DLin-K-C3-DMA (▲) y DLin-K- C4-DMA (▼). La actividad de las formulaciones de PFV de cada lípido se evaluó en el modelo FVII de ratón.

Los puntos de datos se expresan como un porcentaje de los animales de control con PBS y representa la media del grupo (n = 4) ± DE.

La Figura 3 es un gráfico que representa la cantidad de FVII residual después de la administración de diferentes dosis de las formulaciones indicadas de partículas lipídicas - ácido nucleico que comprenden ARNpi de FVII encapsulado a ratones.

La Figura 4 es un gráfico que representa la cantidad de FVII residual después de la administración de diferentes dosis de las formulaciones indicadas de partículas lipídicas - ácido nucleico que comprenden ARNpi de FVII encapsulado a ratas.

La Figura 5 es un gráfico que compara la cantidad de FVII residual después de la administración de dos formulaciones de partículas lipídicas - ácido nucleico (DLin-K-C2-DMA o DLin-K-DMA) que comprenden ARNpi de FVII encapsulado a ratones o ratas.

La Figura 6 es un gráfico que compara la cantidad de FVII residual después de la administración de diferentes concentraciones de tres formulaciones diferentes de partículas lipídicas - ácido nucleico (DLin-K6-DMA, DLin-K-C2-DMA, y DLin-K-DMA) que comprenden ARNpi de FVII encapsulado a ratones.

La Figura 7 es un gráfico que representa la cantidad de FVII residual después de la administración de diferentes dosis de las formulaciones indicadas de partículas lipídicas - ácido nucleico que comprenden ARNpi de FVII encapsulado a los animales. C2 indica DLin-K-C2-DMA; C3 indica DLin-K-C3-DMA; y C4 indica DLin-K-C4-DMA.

La Figura 8 es un gráfico que muestra la cantidad de FVII residual después de la administración de diferentes dosis de las formulaciones de partículas lipídicas - ácido nucleico que comprenden los diferentes lípidos catiónicos indicados: DLinDAP (●), DLinDMA (▲), DLin-K-DMA (■), o DLin-K-C2-DMA (◆).

Las Figuras 9A-B ilustran la eficacia de las formulaciones KC2-SNALP. La Figura 9A es un gráfico que muestra la eficacia mejorada de KC2-SNALP frente a una formulación PFV de DLin-K-C2-DMA en ratones. La eficacia *in vivo* de KC2-SNALP (O) se comparó con la de la formulación PFV de DLin-KC2-DMA no optimizada (●) en el modelo de ratón FVII. Los puntos de datos se expresan como un porcentaje de los animales de control con PBS y representan la media del grupo (n = 5) ± DE. La Figura 9B representa la eficacia de KC2-SNALP en primates no humanos. Monos cynomolgus (n = 3 por grupo) recibieron ya sea 0,03; 0,1; 0,3 o 1 mg / kg de siTTR, o 1 mg / kg siApoB formulado en KC2-SNALP o PBS como infusiones intravenosas de 15 minutos (5 mL / kg) a través de la vena cefálica.

Los animales fueron sacrificados a las 48 horas después de la administración. Los niveles de ARNm de TTR con relación a los niveles de ARNm de GAPDH se determinaron en muestras de hígado. Los puntos de datos representan la media del grupo ± DE. \* = P <0,05; \*\* = P <0,005.

#### Descripción detallada

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de nuevos lípidos catiónicos que proporcionan resultados superiores cuando se utilizan en partículas lipídicas para el suministro *in vivo* de un agente terapéutico. En particular, la presente invención proporciona composiciones de partículas lipídicas - ácido nucleico (también conocidas como formulaciones o formulaciones liposomales) que comprenden un lípido catiónico de acuerdo con la presente invención que proporcionan un aumento de la actividad del ácido nucleico y una tolerabilidad significativa de las composiciones *in vivo*, que se espera que se correlacione con un aumento significativo en el índice terapéutico, en comparación con las composiciones de partículas lipídicas - ácido nucleico descritas anteriormente.

Como se describe en los Ejemplos adjuntos, se empleó un enfoque de diseño racional para el descubrimiento de nuevos lípidos para uso en sistemas de partículas lipídicas de próxima generación para suministrar ácidos nucleicos,

incluyendo, por ejemplo, terapéutica de ARNi. Usando este enfoque, se describieron importantes consideraciones de estructura - actividad para los lípidos catiónicos ionizables, y se diseñaron y caracterizaron múltiples lípidos con base en la estructura DLinDMA. Las partículas lipídicas - ácido nucleico que comprenden el lípido catiónico denominado DLin-K-C2-DMA, mostraron ser bien toleradas tanto en roedores como en primates no humanos y exhibieron actividad *in vivo* con dosis de ARNpi tan bajas como 0,01 mg / kg en roedores, así como el silenciamiento de un gen terapéuticamente significativo (TTR) en primates no humanos. En forma notable, el silenciamiento de TTR logrado en este trabajo (ED<sub>50</sub> ~ 0,3 mg / kg), representa una mejora significativa en la actividad en relación con reportes anteriores de silenciamiento mediado por LNP-ARNpi en primates no humanos. Se cree que la eficacia observada en este estudio representa el nivel más alto de potencia observado para una terapéutica de ARNi en primates no humanos hasta la fecha.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona específicamente composiciones mejoradas para el suministro de moléculas de ARNpi. Se muestra en la presente memoria que estas composiciones son efectivas en la subregulación de los niveles de proteína y / o los niveles de ARNm de proteínas objetivo. Las partículas lipídicas y las composiciones de la presente invención se pueden usar para una variedad de propósitos, incluyendo el suministro de agentes terapéuticos encapsulados o asociados a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, la presente invención se relaciona con métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto que requiera de los mismos, poniendo en contacto al sujeto con una partícula lipídica de la presente invención asociada con un agente terapéutico adecuado.

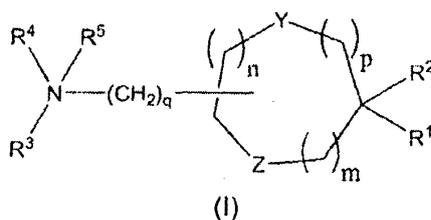
Como se describe en la presente memoria, las partículas lipídicas de la presente invención son particularmente útiles para el suministro de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, moléculas de ARNpi y plásmidos. Por lo tanto, las partículas lipídicas y las composiciones de la presente invención se pueden usar para modular la expresión de los genes objetivo y proteínas tanto *in vitro* como *in vivo* poniendo en contacto células con una partícula lipídica de la presente invención junto con un ácido nucleico que reduce la expresión del gen objetivo (por ejemplo, un ARNpi) o un ácido nucleico que puede utilizarse para aumentar la expresión de una proteína deseada (por ejemplo, un plásmido que codifica la proteína deseada).

Varios ejemplos de realización de los lípidos catiónicos de la presente invención, así como partículas lipídicas y composiciones que los contienen, y su uso para suministrar agentes terapéuticos y modular la expresión génica y proteica se describen con más detalle a continuación.

#### A. Aminolípidos

La presente invención proporciona nuevos aminolípidos que se utilizan ventajosamente en las partículas lipídicas de la presente invención para la administración *in vivo* de agentes terapéuticos a las células, incluyendo aminolípidos que tienen las siguientes estructuras.

En una forma de realización de la invención, el amino lípido tiene la siguiente estructura (I):



en donde

R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son o bien iguales o diferentes y son independientemente alquilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> sustituido, alqueno C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido, alquinilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido, o acilo C<sub>12</sub> - C<sub>24</sub> opcionalmente sustituido;

R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> son o bien iguales o diferentes y son independientemente alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, alqueno C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, o alquinilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido, o R<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> se pueden unir para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos escogidos entre nitrógeno y oxígeno;

R<sup>5</sup> está o bien ausente o es hidrógeno o alquilo C<sub>1</sub> - C<sub>6</sub> para proporcionar una amina cuaternaria;

m, n, y p son o bien iguales o diferentes y son independientemente 0 o 1 con la condición de que m, n, y p no sean simultáneamente 0;

Y y Z son o bien iguales o diferentes e independientemente O, S, o NH; y

q es 2.

5 "Alquilo" significa un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificada, cíclica o no cíclica, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Alquilos representativos saturados de cadena lineal incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo, y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, sec-butilo, isobutilo, ter-butilo, isopentilo, y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo, y similares.

10 "Alqueno" significa un grupo alquilo, como se definió anteriormente, que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen tanto los isómeros cis como trans. Alquenos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares.

15 "Alquino" significa cualquier grupo alquilo o alqueno, como se definió anteriormente, que contiene adicionalmente al menos un triple enlace entre los carbonos adyacentes. Alquinos representativos de cadena lineal y ramificada incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butenilo, 2-butenilo, 1-penteno, 2-penteno, 3-metil-1-butenilo, y similares.

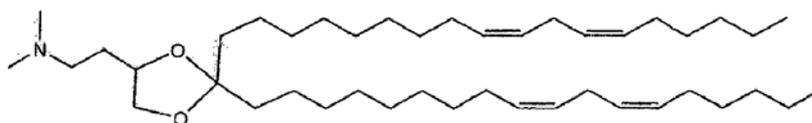
"Acilo" significa cualquier grupo alquilo, alqueno, o alquino en el que el carbono en el punto de unión está sustituido con un grupo oxo, como se define a continuación. Por ejemplo, -C(=O)alquilo, -C(=O)alqueno, y -C(=O)alquino son grupos acilo.

20 "Heterociclo" significa un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros, o bicíclico de 7 a 10 miembros, heterocíclico que está o bien saturado, insaturado, o aromático, y que contiene de 1 a 2 heteroátomos seleccionados independientemente a partir de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores están fusionados a un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos como se define a continuación. Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperazinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

30 Los términos "alquilo opcionalmente sustituido", "alqueno opcionalmente sustituido", "alquino opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido", y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando están sustituidos, se sustituye por lo menos un átomo de hidrógeno con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O) se reemplazan dos átomos de hidrógeno. A este respecto, los sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR<sup>x</sup>, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup> y -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, en donde n es 0, 1 o 2, R<sup>x</sup> y R<sup>y</sup> son iguales o diferentes e independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de dichos sustituyentes alquilo y heterociclo pueden estar sustituidos adicionalmente con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR<sup>x</sup>, heterociclo, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup> y -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>.

"Halógeno" significa flúor, cloro, bromo y yodo.

En ciertas formas de realización, un amino lípido de la presente invención tiene una de las siguientes estructuras:



**DLin-K-C2-DMA**

C<sub>43</sub>H<sub>79</sub>NO<sub>2</sub>

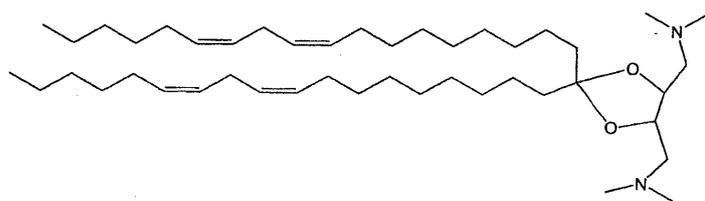
Masa Exacta: 641.61

Peso Molecular: 642.09

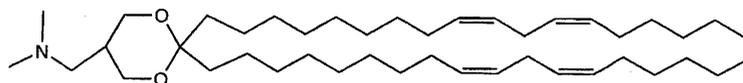
C, 80.43; H, 12.40; N, 2.18; O, 4.98;

40

En ciertas realizaciones, un amino lípido de la presente invención tiene una de las siguientes estructuras:



DLin-K<sup>2</sup>-DMA;



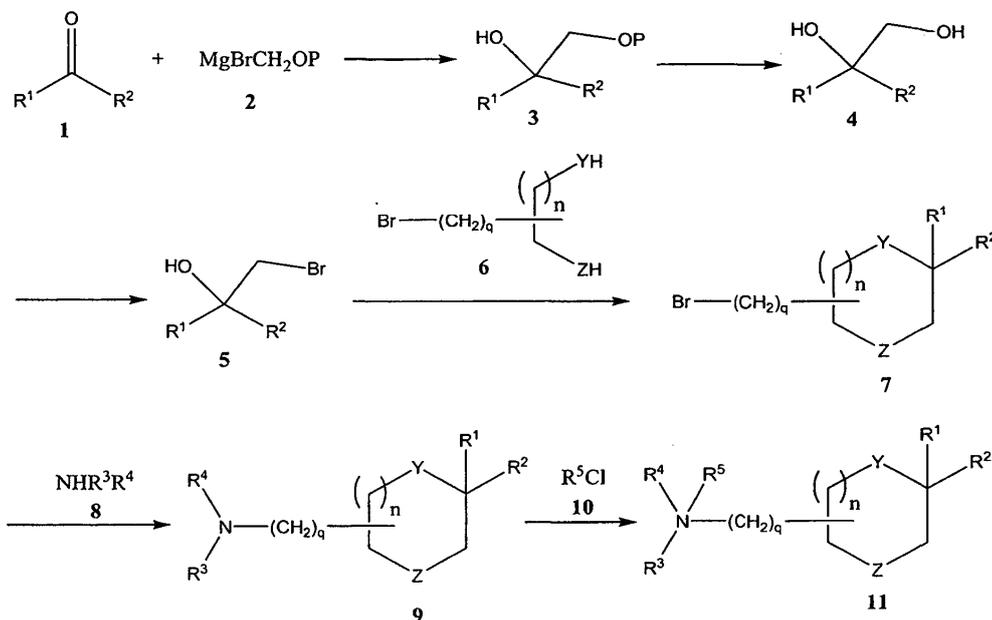
DLin-K6-DMA;

En algunas formas de realización, los métodos de la invención pueden requerir el uso de grupos de protección. La metodología de grupos de protección es bien conocida para aquellos capacitados en la técnica (véase, por ejemplo, Protective Groups in Organic Synthesis, Green, T. W. et. al., Wiley-Interscience, Nueva York, 1999). En resumen, los grupos protectores en el contexto de esta invención son cualquier grupo que reduce o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional. Un grupo protector puede ser añadido a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y luego se retira para revelar el grupo funcional original. En algunas formas de realización se utiliza un "grupo protector de alcohol". Un "grupo protector de alcohol" es cualquier grupo que disminuye o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional alcohol. Los grupos protectores se pueden añadir y eliminar usando técnicas bien conocidas en la técnica.

Los compuestos de la presente invención se pueden preparar por medio de técnicas conocidas de síntesis orgánica, incluyendo los métodos descritos en más detalle en los Ejemplos. En general, los compuestos de estructura (I) mostrados más arriba se pueden preparar mediante los siguientes Esquemas de Reacción 1 o 2, en los que todos los sustituyentes son como se definió anteriormente a menos que se indique lo contrario.

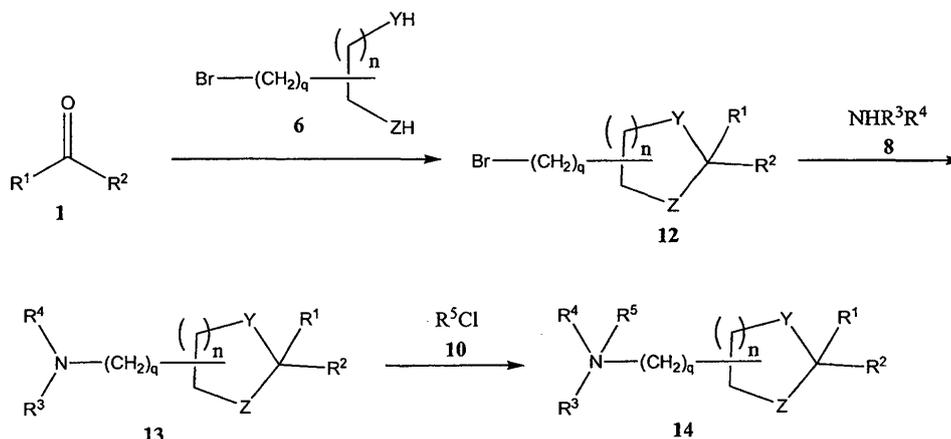
Los compuestos de estructura (I) en los que m es 1 y p es 0 pueden prepararse de acuerdo con el Esquema de Reacción 1. Cetona 1 y el reactivo de Grignard 2, en donde P es un grupo protector de alcohol tal como tritilo, se pueden comprar o preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica. La Reacción de 1 y 2 produce alcohol 3. La desprotección de 3, por ejemplo por tratamiento con ácido suave, seguido de bromación con un reactivo de bromación adecuado, por ejemplo, tribromuro de fósforo, produce 4 y 5 respectivamente. El tratamiento del bromuro 5 con 6 produce el compuesto heterocíclico 7. El tratamiento de 7 con amina 8 proporciona entonces un compuesto de estructura (I) en el que m es 1 y R<sup>5</sup> es ausente (9). Además, el tratamiento de 9 con cloruro 10 produce los compuestos de estructura (I) en los que m es 1 y R<sup>5</sup> está presente.

1. Esquema de Reacción 1



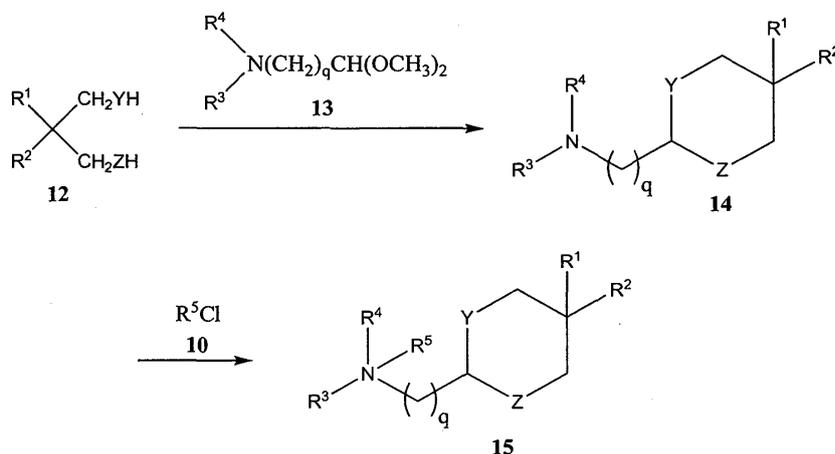
Los compuestos de estructura (I) en los que m y p son 0 se pueden preparar de acuerdo con el Esquema de Reacción 2. La cetona 1 y el bromuro 6 se pueden comprar o preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica. La reacción de 1 y 6 produce heterociclo 12. El tratamiento de 12 con la amina 8 proporciona los compuestos de estructura (I) en los que m es 0 y R<sup>5</sup> es ausente (13). El tratamiento adicional de 13 con 10 produce compuestos de estructura (I) en los que w es 0 y R<sup>5</sup> está presente.

2. Esquema de Reacción 2



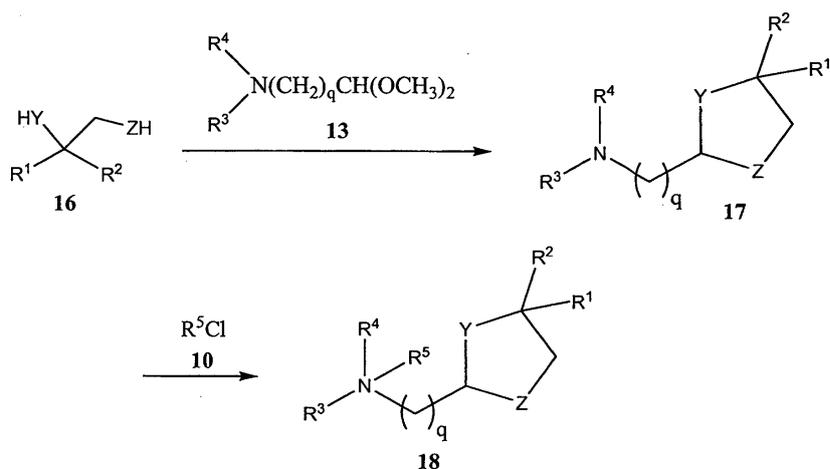
En ciertas realizaciones en las que m y p son 1 y n es 0, los compuestos de esta invención se pueden preparar de acuerdo con el Esquema de Reacción 3. Los compuestos 12 y 13 se pueden comprar o preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica. La reacción de 12 y 13 produce un compuesto de estructura (I) en donde R<sup>5</sup> está ausente (14). En otras realizaciones en las que R<sup>5</sup> está presente, se puede tratar 13 con 10 para obtener compuestos de estructura 15.

3. Esquema de Reacción 3



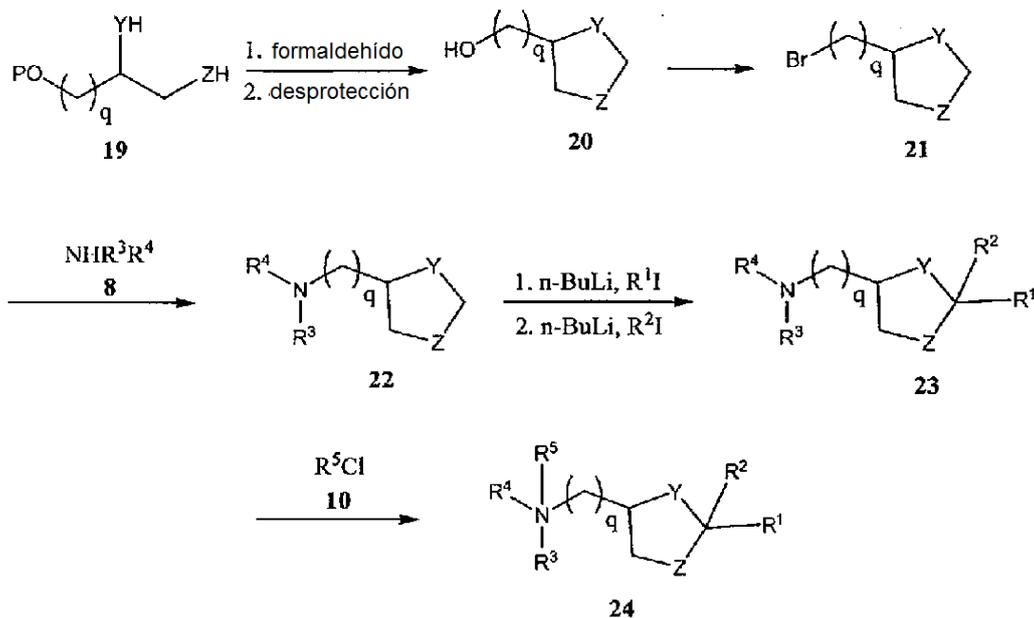
En ciertas otras realizaciones en las que o bien m o p es 1 y n es 0, los compuestos de esta invención se pueden preparar de acuerdo con el Esquema de Reacción 4. El compuesto 16 puede comprarse o prepararse de acuerdo con métodos conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica y se hace reaccionar con 13 para producir un compuesto de estructura (I) en donde R<sup>5</sup> está ausente (17). Otras formas de realización de la estructura (I) en donde R<sup>5</sup> está presente se pueden preparar por tratamiento de 17 con 10 para producir compuestos de estructura 18.

4. Esquema de Reacción 4



En ciertas formas de realización específicas de la estructura (I) donde n es 1 y m y p son 0, los compuestos de esta invención se pueden preparar de acuerdo con el Esquema de Reacción 5. El compuesto 19 puede comprarse o prepararse de acuerdo con métodos conocidos por aquellos normalmente capacitados en la técnica. La reacción de 19 con formaldehído seguido por la eliminación de un grupo protector de alcohol opcional (P), produce el alcohol 20. La bromación de 20 seguida por tratamiento con la amina 8 proporciona 22. El compuesto 22 puede entonces ser tratado con n-butil litio y R<sup>1</sup>I seguido por tratamiento adicional con n-butil litio y R<sup>2</sup>I para producir un compuesto de estructura (I) en donde R<sup>5</sup> está ausente (23). El tratamiento adicional de 23 con 10 produce un compuesto de estructura (I) en donde R<sup>5</sup> está presente (24).

10 5. Esquema de Reacción 5



En realizaciones particulares, los aminolípidos de la presente invención son lípidos catiónicos. Tal como se usa en el presente documento, el término "amino lípido" se entiende que incluye aquellos lípidos que tienen uno o dos ácidos grasos o cadenas alquilo grasas y un grupo de cabeza amino (incluyendo un grupo alquilamino o dialquilamino) que pueden ser protonado para formar un lípido catiónico a pH fisiológico.

Otros aminolípidos incluirían aquellos que tienen grupos alternativos de ácido graso y otros grupos dialquilamino, incluyendo aquellos en los que los sustituyentes alquilo son diferentes (por ejemplo, N-etil-N-metilamino-, N-propil-N-etilamino- y similares). Para aquellas realizaciones en las que R<sup>11</sup> y R<sup>12</sup> son ambos grupos alquilo o acilo de cadena larga, que pueden ser iguales o diferentes. En general, los aminolípidos que tienen menos cadenas acilo saturadas pueden tener más fácilmente un tamaño especificado, particularmente cuando los complejos deben tener un tamaño por especificado debajo de aproximadamente 0,3 micras, para los propósitos de esterilización del filtro. Se prefieren aminolípidos que contienen ácidos grasos insaturados con longitudes de cadena carbonada en el intervalo de C<sub>14</sub> a

C<sub>22</sub>. También se pueden utilizar otros andamios para separar el grupo amino y el ácido graso o una porción alquilo graso del amino lípido. Andamios adecuados son conocidos por aquellos capacitados en la técnica.

5 En ciertas realizaciones, aminolípidos o lípidos catiónicos de la presente invención tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de tal manera que el lípido se carga positivamente a un pH en o por debajo del pH fisiológico (por ejemplo, pH 7,4), y es neutro a un segundo pH, preferiblemente en o por encima del pH fisiológico. Se entenderá, por supuesto, que la adición o eliminación de protones como una función del pH es un proceso de equilibrio, y que la referencia a un lípido cargado o neutro se refiere a la naturaleza de la especie predominante y no requiere que todo el lípido esté presente en la forma cargada o neutra. Los lípidos que tienen más de un grupo protonable o desprotonable, o que son zwitteriónicos, no están excluidos de uso en la invención.

10 En ciertas realizaciones, los lípidos protonables de acuerdo con la invención tienen un pKa del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 11. Lo más preferido es un pKa de aproximadamente 4 hasta aproximadamente 7, porque estos lípidos serán catiónicos en una etapa de la formulación de pH más bajo, mientras que las partículas serán en gran medida (aunque no completamente) neutralizadas en la superficie a un pH fisiológico de alrededor de 7,4. Uno de los beneficios de este pKa es que al menos algo del ácido nucleico asociado con la superficie exterior de la partícula perderá su interacción electrostática a pH fisiológico y será eliminado por simple diálisis; esto reduce considerablemente la susceptibilidad de la partícula de ser eliminada.

#### B. Partículas lipídicas

20 La presente invención también proporciona partículas lipídicas que comprenden uno o más de los aminolípidos descritos anteriormente. Las partículas lipídicas incluyen, pero no se limitan a, liposomas. Como se usa en el presente documento, un liposoma es una estructura que tiene membranas que contienen lípidos que encierran un interior acuoso. Los liposomas pueden tener una o más membranas lipídicas. La invención contempla tanto liposomas de una sola capa, que se conocen como unilamelares como liposomas de múltiples capas, que se conocen como multilamelares. Cuando forman complejos con ácidos nucleicos, las partículas lipídicas también pueden ser lipoplexos, que están compuestos de bicapas de lípidos catiónicos intercaladas entre capas de ADN, tal como se describe, por ejemplo, en Felgner, Scientific American.

25 Las partículas lipídicas de la presente invención pueden comprender además uno o más lípidos adicionales y / u otros componentes, tales como colesterol. Se pueden incluir otros lípidos en las composiciones de liposomas de la presente invención para una variedad de propósitos, tales como para evitar la oxidación lipídica o para unir ligandos a la superficie del liposoma. Cualquiera entre una cantidad de lípidos pueden estar presentes en los liposomas de la presente invención, incluyendo lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos, y aniónicos. Tales lípidos pueden ser utilizados solos o en combinación. Ejemplos específicos de componentes lipídicos adicionales que pueden estar presentes se describen a continuación.

30 En ciertas realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención comprenden un aminolípido descrito anteriormente, un lípido neutro o no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. En ciertas realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención comprenden un aminolípido descrito anteriormente, un lípido neutro o no catiónico, un esteroles, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. En formas de realización particulares, estas partículas lipídicas comprenden además un lípido catiónico además del aminolípido de la presente invención.

40 Los componentes adicionales que pueden estar presentes en una partícula lipídica de la presente invención incluyen componentes estabilizadores de la bicapa tales como oligómeros de poliamida (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.320.017), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos, tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado con ceramidas (véase, la patente de los Estados Unidos No. 5.885.613).

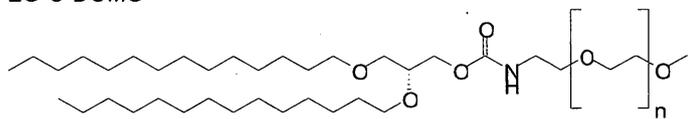
45 Ejemplos de lípidos que reducen la agregación de partículas durante la formación incluyen lípidos modificados con polietilenglicol (PEG), monosialogangliósido Gm1, y oligómeros de poliamida ("PAO") tales como (descritos en la patente de los Estados Unidos No. 6.320.017). Otros compuestos con fracciones hidrófilas no cargadas que actúan como barrera estérica, que impiden la agregación durante la formulación, como PEG, Gm1 o ATTA, también se pueden acoplar a los lípidos para uso como en los métodos y composiciones de la invención. Los lípidos - ATTA se describen, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos No. 6.320.017, y los conjugados de PEG-lípido se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.820.873, 5.534.499 y 5.885.613. Típicamente, la concentración del componente lipídico seleccionado para reducir la agregación es aproximadamente de 1 a 15% (por ciento en moles de lípidos).

55 Ejemplos específicos de lípidos modificados con PEG (o conjugados de lípido-polioxi-etileno) que son útiles en la presente invención pueden tener una variedad de porciones lipídicas de "anclaje" para asegurar la porción de PEG a la superficie de la vesícula lipídica. Ejemplos de lípidos adecuados modificados con PEG incluyen fosfatidiletanolamina modificada con PEG y ácido fosfatídico, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-

CerC14 o PEG-CerC20) que se describen en la solicitud de patente en trámite USSN 08/486.214, dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Particularmente preferidos son los diacilglicérols y dialquilglicérols modificados con PEG.

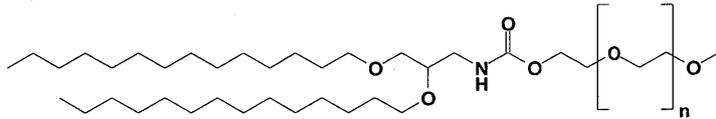
En realizaciones particulares, un PEG-lípido se selecciona de entre:

PEG-C-DOMG



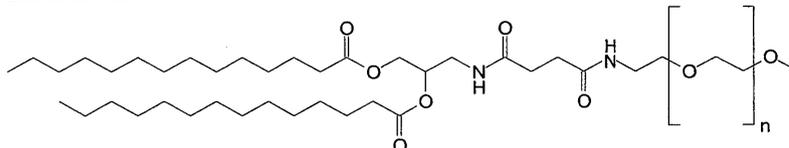
5

PEG- DMA



y

PEG-S-DMG



En realizaciones en las que una fracción estéricamente grande tal como PEG o ATTA se conjuga con un ancla lipídica, la selección del ancla lipídica depende de qué tipo de asociación tiene el conjugado con la partícula lipídica. Es bien sabido que mePEG (pm 2000) - diastearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) permanecerá asociado con un liposoma hasta que la partícula se elimina de la circulación, posiblemente, en un lapso de días. Otros conjugados, tales como PEG-CerC20 tienen una capacidad de permanencia similar. PEG-CerC14, sin embargo, sale rápidamente de la formulación después de la exposición al suero, con un  $T_{1/2}$  menor a 60 minutos en algunos ensayos. Como se ilustra en la solicitud de patente de los Estados Unidos SN 08/486.214, por lo menos tres características influyen en el tipo de cambio: la longitud de la cadena de acilo, la saturación de la cadena de acilo, y el tamaño del grupo de cabeza que sirve de barrera estérica. Los compuestos que tienen variaciones adecuadas de estas características pueden ser útiles para la invención. Para algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser preferible que el lípido modificado con PEG se pierda rápidamente de la partícula lipídica que contiene ácido nucleico *in vivo* y por lo tanto, el lípido modificado con PEG poseerá anclajes lipídicos relativamente cortos. En otras aplicaciones terapéuticas, puede ser preferible que la partícula lipídica que contiene ácido nucleico exhiba un tiempo de vida más largo de circulación en el plasma y por lo tanto el lípido modificado con PEG poseerá relativamente anclajes lipídicos más largos.

Cabe señalar que la agregación evita que los compuestos no necesariamente requieran la conjugación de lípidos para funcionar correctamente. PEG libre o ATTA libre en solución pueden ser suficientes para evitar la agregación. Si las partículas son estables después de la formulación, el PEG o ATTA se pueden dializar antes de la administración a un sujeto.

El término "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido anfipático, así como cualquier otro lípido neutro o lípido aniónico. Los lípidos no catiónicos utilizados en las partículas lipídicas, por ejemplo, SNALP, de la presente invención pueden ser cualquiera de una variedad de lípidos neutros no cargados, zwitteriónicos, o aniónicos capaces de producir un complejo estable.

El término "lípido neutro" se refiere a cualquiera entre una cantidad de especies de lípidos que existen ya sea en una forma zwitteriónica neutra o no cargada a un pH seleccionado. A pH fisiológico, tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos, y diacilglicérols.

El término "lípido aniónico" se refiere a cualquier lípido que está cargado negativamente a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicérols, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoil fosfatidiletanolaminas, N-succinil fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilglicérols, palmitoileoilfosfatidilglicérol (POPG), y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros. Tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida,

esfingomielina, dihidroesfingomielina, cefalina, y cerebrósidos. La selección de lípidos neutros para su uso en las partículas descritas en el presente documento es guiada generalmente por la consideración, por ejemplo, del tamaño del liposoma y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Preferiblemente, el componente lipídico neutro es un lípido que tiene dos grupos acilo, (es decir, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina). Los lípidos que tienen una variedad de grupos de cadena acilo de longitud de cadena variable y grado de saturación se encuentran disponibles o se pueden aislar o sintetizar mediante técnicas bien conocidas. En un grupo de realizaciones, se prefieren los lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de cadena carbonada en el intervalo de C<sub>14</sub> a C<sub>22</sub>. En otro grupo de realizaciones, se usan lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de cadena carbonada en el intervalo de C<sub>14</sub> a C<sub>22</sub>. Además, se pueden utilizar lípidos que tienen mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Preferiblemente, los lípidos neutros utilizados en la presente invención son DOPE, DSPC, POPC, o cualquier fosfatidilcolina relacionada. Los lípidos neutros útiles en la presente invención también pueden estar compuestos de esfingomielina, dihidroesfingomielina, o fosfolípidos con otros grupos de cabeza, tales como serina e inositol.

Los ejemplos no limitantes de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, dicetilfosfato, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), dioleoilfosfatidiletanolamina 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, y mezclas de los mismos. Otros fosfolípidos de diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina también se pueden utilizar. Los grupos acilo en estos lípidos son preferiblemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas carbonadas de C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>, por ejemplo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, u oleoilo.

Ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroides tales como colesterol y derivados de los mismos tales como colestanol, colestanona, colestenona, y coprostanol.

En algunas formas de realización, el lípido no catiónico presente en la partícula lipídica, por ejemplo, SNALP, comprende o consiste en colesterol, por ejemplo, SNALP libre de fosfolípido. En otras formas de realización, el lípido no catiónico presente en la partícula lipídica, por ejemplo, SNALP comprende o consiste en uno o más fosfolípidos, por ejemplo, SNALP libre de colesterol. En otras formas de realización, el lípido no catiónico presente en la SNALP comprende o consiste en una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol.

Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para uso en la presente invención incluyen lípidos que no contienen fósforo tales como, por ejemplo, estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, palmitato de acetilo, glicerolricinoleato, estearato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfóteros, lauril sulfato de trietanolamina, amidas de ácido graso alquil-aril sulfato polietiloxiladas, bromuro de dioctadecildimetil amonio, ceramida, esfingomielina, y similares.

El lípido no catiónico comprende típicamente de aproximadamente 13% en moles hasta aproximadamente 49,5% en moles, de aproximadamente 20% en moles hasta aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 25% en moles hasta aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 30% en moles hasta aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 35 % en moles hasta aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 20% en moles hasta aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 25% en moles hasta aproximadamente 40% en moles, o de aproximadamente 30% en moles hasta aproximadamente 40% en moles del lípido total presente en la partícula.

El componente esteroil de la mezcla de lípidos, cuando está presente, puede ser cualquiera de los esteroides utilizados convencionalmente en el campo de liposomas, vesículas lipídicas o en la preparación de partículas lipídicas. Un esteroil preferido es el colesterol.

Otros lípidos catiónicos, que transportan una carga positiva neta a pH aproximadamente fisiológico, además de los específicamente descritos anteriormente, también se pueden incluir en partículas lipídicas de la presente invención. Tales lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trietilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); sal cloruro de 1,2-dioleiloxi-3-trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3β-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol ("DC-Chol"); trifluoroacetato de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil-N,N-dimetilamonio ("DOSPA"); dioctadecilamidoglicil carboxiespermina ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA"), y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxi)prop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio ("DMRIE"). Adicionalmente, se pueden utilizar una cantidad de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, LIPOFECTINA (incluyendo DOTMA y

DOPE, disponible a través de GIBCO / BRL), y LIPOFECTAMINA (que comprende DOSPA y DOPE, disponible a través de GIBCO / BRL). En realizaciones particulares, un lípido catiónico es un aminolípido.

En numerosas realizaciones, se incluyen lípidos anfipáticos en las partículas lipídicas de la presente invención. "Lípidos anfipáticos" se refiere a cualquier material adecuado, en el que la parte hidrófoba del material lipídico se orienta en una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrofílica se orienta hacia la fase acuosa. Tales compuestos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Los fosfolípidos representativos incluyen esfingomiélin, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina. También se pueden utilizar otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles, y  $\beta$ -aciloxiácidos. Adicionalmente, tales lípidos anfipáticos se pueden mezclar fácilmente con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides.

También son adecuados para inclusión en las partículas lipídicas de la presente invención los lípidos de fusión programables. Tales partículas lipídicas tienen poca tendencia a fusionarse con las membranas celulares y entregar su carga útil hasta que se produce un evento de señal dado. Esto permite que la partícula lipídica se distribuya de manera más uniforme después de la inyección en un organismo o en el sitio de enfermedad antes de que comience la fusión con las células. El evento de señal puede ser, por ejemplo, un cambio en el pH, la temperatura, el medio iónico, o el tiempo. En este último caso, un retraso en la fusión o del componente de "encubrimiento", tal como un conjugado de ATTA-lípido o un conjugado de PEG-lípido, simplemente pueden salir fuera de la membrana de la partícula lipídica con el tiempo. Con el tiempo, la partícula lipídica se distribuye adecuadamente en el cuerpo, ha perdido suficiente agente de encubrimiento de modo que se torna fusogénico. Con otros eventos de señal, es deseable elegir una señal que esté asociada con el sitio de la enfermedad o célula objetivo, tal como un aumento de la temperatura en el sitio de la inflamación.

En ciertas realizaciones, es deseable dirigir las partículas lipídicas de la presente invención utilizando fracciones de direccionamiento que sean específicas para un tipo de célula o tejido. El direccionamiento de partículas lipídicas usando una variedad de fracciones de direccionamiento, tales como ligandos, receptores de superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos monoclonales, ha sido descrito previamente (véase, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.957.773 y 4.603.044). Las fracciones de direccionamiento pueden comprender la proteína entera o fragmentos de la misma. Los mecanismos de direccionamiento requieren generalmente que los agentes de direccionamiento sean colocados en la superficie de la partícula lipídica de una forma tal que la fracción objetivo esté disponible para la interacción con el objetivo, por ejemplo, un receptor de superficie celular. Se conocen y están disponibles en el arte una variedad de agentes de direccionamiento diferentes y métodos, incluyendo los descritos, por ejemplo, en Sapra, P. y Allen, T. M., *Prog. Lipid Res.* 42(5): 439 - 62 (2003); y Abra, R. M. et al., *J. Liposome Res.* 12: 1 - 3, (2002).

Se ha propuesto el uso de partículas lipídicas, es decir, liposomas, con un recubrimiento superficial de cadenas poliméricas hidrofílicas, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG), para el direccionamiento (Allen, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99 - 108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101 - 6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180 - 184 (1993); Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321 - 334 (1992); patente de los Estados Unidos No. 5.013.556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296 - 299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71 - 74 (1994); Zalipsky, en *Stealth Liposomes*, Capítulo 9 (Lasic y Martin, Eds.) CRC Press, Boca Raton FL (1995). En un enfoque, un ligando, tal como un anticuerpo, para dirigir la partícula lipídica se enlaza con el grupo de cabeza polar de los lípidos que forman la partícula lipídica. En otro enfoque, el ligando de direccionamiento se une a los extremos distales de las cadenas de PEG que forman el revestimiento polimérico hidrofílico (Klibanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321 - 334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115 - 118 (1996)).

Se pueden utilizar métodos estándar para el acoplamiento de los agentes objetivo. Por ejemplo, se pueden utilizar fosfatidiletanolamina, que se puede activar para la unión de agentes objetivo, o compuestos lipofílicos derivados, tales como bleomicina derivada de lípidos. Se pueden construir liposomas destinados a anticuerpos usando, por ejemplo, liposomas que incorporan proteína A (véase, Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265: 16337 - 16342 (1990) y Leonetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (Estados Unidos)*, 87: 2448 - 2451 (1990). Otros ejemplos de conjugación de anticuerpos se describen en la patente de los Estados Unidos No. 6.027.726. Ejemplos de fracciones de direccionamiento también pueden incluir otras proteínas, específicas para componentes celulares, incluyendo antígenos asociados con neoplasias o tumores. Las proteínas utilizadas como fracciones de direccionamiento pueden estar unidas a los liposomas a través de enlaces covalentes (véase, Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149 *Methods in Enzymology* 111 - 119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros métodos de direccionamiento incluyen el sistema biotina-avidina.

En una forma de realización a modo de ejemplo, la partícula lipídica comprende una mezcla de un aminolípido de la presente invención, lípidos neutros (distintos al aminolípido), un esteroil (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-S-DMG, PEG-C-DMG o PEG-DMA). En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos consiste de o consiste esencialmente de un aminolípido de la presente invención, un lípido neutro,

colesterol, y un lípido modificado con PEG. En otras realizaciones preferidas, la partícula lipídica consiste de, o consiste esencialmente de la mezcla de lípidos anterior en relaciones molares de aproximadamente 20 - 70% de aminolípido: 5 - 45% de lípido neutro: 20 - 55% de colesterol: 0,5 - 15% de lípido modificado con PEG.

5 En formas de realización particulares, la partícula lipídica consiste de, o consiste esencialmente de DLin-K-C2-DMA, DSPC, Chol, y, o bien de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de aproximadamente 20 - 60% de DLin-K-C2-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la relación molar de lípidos es de aproximadamente 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG o DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-C-DOMG o DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-DMA) o 35 / 15 / 40 / 10 % en moles de DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG o DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-C-DOMG o DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-DMA. En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza con POPC, DOPE o SM.

15 En formas de realización particulares, la partícula lipídica consiste de, o consiste esencialmente de DLin-K<sup>2</sup>-DMA, DSPC, Chol, y, o bien de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de alrededor de 20 - 60% de DLin-K<sup>2</sup>-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la relación molar de lípidos es de aproximadamente 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K<sup>2</sup>-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG o DLin-K<sup>2</sup>-DMA / DSPC / Chol / PEG-C-DOMG o DLin-K<sup>2</sup>-DMA / DSPC / Chol / PEG-DMA) o 35 / 15 / 40 / 10% molar de DLin-K<sup>2</sup>-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG o DLin-K<sup>2</sup>-DMA / DSPC / Chol / PEG-C-DOMG o DLin-K<sup>2</sup>-DMA / DSPC / Chol / PEG-DMA. En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye con POPC, DOPE o SM.

20 En formas de realización particulares, la partícula lipídica consiste de, o consiste esencialmente de DLin-K6-DMA, DSPC, Chol, y, ya sea de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o de PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de alrededor de 20 - 60% de DLin-K6-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la relación molar de lípidos es de aproximadamente de 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K6-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG o DLin-K6-DMA / DSPC/Chol/PEG-C-DOMG o DLin-K6-DMA / DSPC / Chol / PEG-DMA) o 35 / 15 / 40 / 10% en moles de DLin-K6-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG o DLin-K6-DMA / DSPC / Chol / PEG-C-DOMG o DLin-K6-DMA / DSPC / Chol / PEG-DMA. En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza con POPC, DOPE o SM.

### C. Composiciones y formulaciones de partículas lipídicas - agente terapéutico

30 La presente invención incluye composiciones que comprenden una partícula lipídica de la presente invención y un agente activo, en las que el agente activo está asociado con la partícula lipídica. En realizaciones particulares, el agente activo es un agente terapéutico. En realizaciones particulares, el agente activo se encapsula dentro del interior acuoso de la partícula lipídica. En otras formas de realización, el agente activo está presente dentro de una o más capas de lípido de la partícula lipídica. En otras formas de realización, el agente activo está enlazado a la superficie lipídica exterior o interior de una partícula lipídica.

35 "Totalmente encapsulado" como se usa aquí indica que el ácido nucleico en las partículas no se degrada significativamente después de la exposición a suero o un ensayo de nucleasa que degrade significativamente el ácido nucleico libre. En un sistema totalmente encapsulado, preferiblemente menos del 25% del ácido nucleico de la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría el 100% de ácido nucleico libre, más preferiblemente menos del 10% y lo más preferiblemente menos del 5% del ácido nucleico de la partícula es degradado. Alternativamente, se puede determinar la encapsulación completa mediante un ensayo OliGreen®. OliGreen® es una coloración de ácido nucleico fluorescente ultra sensible para cuantificar oligonucleótidos y ADN o ARN monocatenarios en solución (disponible a través de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Totalmente encapsulado también sugiere que las partículas son estables en suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras la administración *in vivo*.

45 Los agentes activos, tal como se utiliza en la presente memoria, incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado en una célula, tejido, órgano, o sujeto. Estos efectos pueden ser biológicos, fisiológicos, o cosmético, por ejemplo. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto, incluyendo, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos y polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes, y anticuerpos Primatized<sup>MIR</sup>, citoquinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de la diferenciación, receptores de la superficie de la célula y sus ligandos; hormonas, y moléculas pequeñas, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas o compuestos.

55 En una forma de realización, el agente activo es un agente terapéutico, o una sal o derivado de la misma. Los derivados del agente terapéutico pueden ser terapéuticamente activos en sí mismos o pueden ser profármacos, que se vuelven activos tras una modificación adicional. Por lo tanto, en una realización, un derivado del agente

terapéutico conserva parte o la totalidad de la actividad terapéutica en comparación con el agente no modificado, mientras que en otra forma de realización, un derivado del agente terapéutico carece de actividad terapéutica.

5 En diversas formas de realización, los agentes terapéuticos incluyen cualquier agente o fármaco terapéuticamente efectivo, tales como compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicamentos para control de la natalidad, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la transducción de señales, fármacos cardiovasculares, por ejemplo, agentes anti-arrítmicos, vasoconstrictores, hormonas y esteroides.

10 En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un fármaco oncológico, que también se puede denominar como un fármaco anti-tumoral, un fármaco anticanceroso, un fármaco tumoral, un agente antineoplásico, o similares. Ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden utilizar de acuerdo con la invención incluyen, pero no se limitan a, adriamicina, alkerán, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, azatioprina, bexaroteno, biCNU, bleomicina, busulfán intravenoso, busulfán oral, capecitabina (Xeloda), carboplatino, carmustina, CCNU, celecoxib, clorambucil, cisplatino, cladribina, ciclosporina A, citarabina, citarabina, daunorrubicina, citoxan, daunorrubicina, dexametasona, dexrazoxano, dodetaxel, doxorubicina, doxorubicina, DTIC, epirubicina, estramustina, fosfato de etopósido, etopósido y VP-16, exemestano, FK506, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, gemcitabina (Gemzar), gemtuzumabozogamicina, acetato de goserelina, hidrea, hidroxurea, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón, irinotecano (Campostar, CPT-111), letrozol, leucovorina, leustatina, leuprolida, levamisol, litretinoína, megastrol, melfalán, L-PAM, mesna, metotrexato, metoxaleno, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, paclitaxel, pamidronato, Pegademas, pentostatina, porfímero sódico, prednisona, rituxano, estreptozocina, STI-571, tamoxifeno, taxotere, temozolamida, tenipósido, VM-26, topotecano (Hycamtin), toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, velban, vinblastina, vincristina, VP16, y vinorelbina. Otros ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden utilizar de acuerdo con la invención son elipticina y análogos o derivados de elipticina, epotilonas, inhibidores de la quinasa intracelular y camptotecinas.

#### 1. Partículas lipídicas - ácido nucleico

25 en ciertas realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención están asociadas con un ácido nucleico, lo que resulta en una partícula lipídica que contiene ácido nucleico. En realizaciones particulares, el ácido nucleico está parcial o totalmente encapsulado en la partícula lipídica. Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" se entiende que incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido. Los fragmentos que contienen hasta 50 nucleótidos se denominan generalmente oligonucleótidos, y fragmentos más largos se denominan polinucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos de la presente invención son de 20 - 50 nucleótidos de longitud.

35 En el contexto de esta invención, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de nucleótidos o monómeros nucleósidos que consisten en bases de origen natural, enlaces entre azúcares y dentro de los azúcares (cadena principal). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" incluyen también polímeros u oligómeros que comprenden monómeros de origen no natural, o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo se prefieren sobre las formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, mejor captación celular y mayor estabilidad en presencia de nucleasas.

40 Los oligonucleótidos se clasifican como desoxirribooligonucleótidos o ribooligonucleótidos. Un desoxirribooligonucleótido consiste en un azúcar de 5 carbonos llamado desoxirribosa unido covalentemente a un fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero no ramificado alternante. Un ribooligonucleótido consiste en una estructura de repetición similar en la que el azúcar de 5 carbonos es ribosa.

45 El ácido nucleico que está presente en una partícula lipídica que contiene ácido nucleico de acuerdo con esta invención incluye cualquier forma de ácido nucleico que se conoce. Los ácidos nucleicos utilizados en el presente documento pueden ser ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario, o híbridos de ADN-ARN. Los ejemplos de ADN bicatenario incluyen genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y de terminación, y sistemas de autorreplicación tales como ADN viral o de plásmido. Ejemplos de ARN bicatenario incluyen ARNpi y otros reactivos de ribointerferencia. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN, y oligonucleótidos formadores de triplex.

50 Los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser de diversas longitudes, dependiendo generalmente de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden ser de aproximadamente 1.000 a 100.000 residuos de nucleótidos de longitud. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden variar de aproximadamente 10 a 100 nucleótidos de longitud. En diversas formas de realización relacionadas, los oligonucleótidos, tanto monocatenarios, bicatenarios, como de cadena triple, pueden variar en longitud desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, aproximadamente 20 o

aproximadamente 50 nucleótidos, desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 30 nucleótidos, desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

5 En realizaciones particulares, un oligonucleótido (o una cadena del mismo) de la presente invención hibrida específicamente a o es complementario a un polinucleótido objetivo. "Hibridar específicamente" y "complementario" son términos que se utilizan para indicar un grado suficiente de complementariedad de tal manera que se produce un enlazamiento estable y específico entre el ADN o el ARN objetivo y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser 100% complementario a su secuencia de ácido nucleico objetivo para ser específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando el enlazamiento del oligonucleótido con el objetivo interfiere con la función normal de la molécula objetivo para causar una pérdida de utilidad o expresión de los mismos, y existe un grado suficiente de complementariedad para evitar el enlazamiento no específico del oligonucleótido a secuencias no objetivo bajo condiciones en las que se desea un enlazamiento específico, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o de tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos. Por lo tanto, en otras formas de realización, este oligonucleótido incluye 1, 2, o 3 sustituciones de bases en comparación con la región de un gen o secuencia de ARNm a la cual se dirige o con la que se hibrida específicamente.

#### Ácidos nucleicos de ribointerferencia (ARN)

En formas de realización particulares, las partículas lipídicas - ácido nucleico de la presente invención se asocian con moléculas de ribointerferencia (ARNi). Se pueden utilizar métodos de ribointerferencia utilizando moléculas de ARNi para alterar la expresión de un gen o polinucleótido de interés. En los últimos 5 años el ARN pequeño de interferencia (ARNpi) ha reemplazado esencialmente al ODN antisentido y a los ribozimas como la siguiente generación de fármacos de oligonucleótidos objetivo en desarrollo. Los ARNpi son dúplex de ARN normalmente de 21 - 30 nucleótidos de longitud que puede asociarse con un complejo de multiproteína citoplasmática conocido como complejo de silenciamiento inducido por ARNi (RISC). RISC cargado con ARNpi media la degradación de transcritos de ARNm homólogos, por lo tanto, ARNpi puede ser diseñado para destruir la expresión de la proteína con una alta especificidad. A diferencia de otras tecnologías antisentido, ARNpi funciona a través de un mecanismo natural que evolucionó para controlar la expresión génica a través de ARN no codificante. Esta se considera generalmente que es la razón por la que su actividad es más potente *in vitro* e *in vivo* que cualquier ODN antisentido o ribozimas. Una variedad de reactivos de ARNi, incluyendo los ARNpi que dirigen clínicamente objetivos relevantes, están actualmente en desarrollo farmacéutico, como se describe, por ejemplo, en de Fougères, A. et al., Nature Reviews 6: 443 - 453 (2007).

Mientras que las primeras moléculas descritas de ARNi eran híbridos de ARN:ARN que comprenden tanto una cadena de ARN sentido como una de ARN antisentido, se ha demostrado ahora que híbridos de ADN sentido:ARN antisentido, híbridos de ARN sentido:ADN antisentido, e híbridos de ADN:ADN son capaces de mediar ARNi (Lamberton, J. S. y Christian, A. T., (2003) Molecular Biotechnology 24: 111 - 119). Por lo tanto, la invención incluye el uso de moléculas de ARNi que comprenden cualquiera de estos diferentes tipos de moléculas bicatenarias. Además, se entiende que se pueden utilizar e introducir moléculas de ARNi a las células en una variedad de formas. De acuerdo con ello, tal como se usa en el presente documento, moléculas de ARNi que abarcan todas y cada una de las moléculas capaces de inducir una respuesta de ARNi en células, incluyendo, pero sin limitarse a, polinucleótidos bicatenarios que comprenden dos cadenas separadas, es decir, una cadena sentido y una cadena antisentido, por ejemplo, ARN pequeño de interferencia (ARNpi); polinucleótidos que comprenden un bucle de horquilla de secuencias complementarias, que forman una región bicatenaria, por ejemplo, moléculas de ARNi de horquilla corta, y vectores de expresión que expresan uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido bicatenario solo o en combinación con otro polinucleótido.

La ribointerferencia (ARNi) se puede utilizar para inhibir específicamente la expresión de polinucleótidos objetivo. La supresión mediada por ARN bicatenario de la expresión génica y del ácido nucleico puede realizarse de acuerdo con la invención mediante la introducción de ARN bicatenario, ARNpi o ARN de horquilla corta en células u organismos. El ARNpi puede ser ARN bicatenario, o una molécula híbrida que comprende tanto ARN como ADN, por ejemplo, una cadena de ARN y una cadena de ADN. Se ha demostrado que la introducción directa de los ARNpi en una célula puede desencadenar ARNi en células de mamífero (Elshabir, S. M., et al. Nature 411: 494 - 498 (2001)). Además, la supresión en células de mamífero ocurrió a nivel del ARN y fue específica para los genes objetivo, con una fuerte correlación entre el ARN y la supresión de proteína (Caplen, N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 98: 9746 - 9747 (2001)). Además, se demostró que una amplia variedad de líneas celulares, incluyendo células HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 y MCF-7, son susceptibles por cierto nivel de silenciamiento de ARNpi (Brown, D. et al. TechNotes 9(1): 1 - 7, disponible en <http://www.dot.ambion.dot.com/techlib/tn/91/912.html> (9/1/02)).

Moléculas de ARNi que dirigen polinucleótidos específicos se pueden preparar fácilmente de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Se han identificado las características estructurales de las moléculas efectivas de ARNpi. Elshabir, S. M. et al. (2001) Nature 411: 494 - 498 y Elshabir, S. M. et al. (2001), EMBO 20: 6877 - 6888. Por lo tanto, alguien capacitado en la técnica entenderá que pueden utilizarse una amplia variedad de

- diferentes moléculas de ARNpi para dirigir un gen o un transcripto específico. En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNpi de acuerdo con la invención son bicatenarias y de 16 - 30 o 18 - 25 nucleótidos de longitud, incluyendo cada número entero en el intervalo. En una forma de realización, un ARNpi es de 21 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los ARNpi tienen 0 - 7 nucleótidos sobresalientes en 3' o 0 - 4 nucleótidos sobresalientes en 5'.
- 5 En una realización, una molécula de ARNpi tiene dos nucleótidos sobresalientes en 3'. En una forma de realización, un ARNpi es de 21 nucleótidos de longitud con dos nucleótidos sobresalientes en 3' (es decir, contienen una región complementaria de 19 nucleótidos entre las cadenas sentido y antisentido). En ciertas formas de realización, los que sobresalen son los sobresalientes en 3' UU o dTdT.
- 10 Generalmente, las moléculas de ARNpi son completamente complementarias a una cadena de una molécula de ADN objetivo, ya que se ha demostrado que incluso faltas de correspondencia de pares de bases individuales reducen el silenciamiento. En otras formas de realización, los ARNpi puede tener una composición modificada de la cadena principal, tal como, por ejemplo, modificaciones 2'-desoxi- o 2'-O-metilo. Sin embargo, en realizaciones preferidas, no se elabora toda la cadena del ARNpi, ya sea con bases 2'-desoxi o 2'-O- modificadas.
- 15 En una realización, los sitios objetivo de ARNpi se seleccionan mediante el escaneo de la secuencia del transcripto de ARNm objetivo por la ocurrencia de secuencias de dinucleótidos AA. Cada secuencia de dinucleótidos AA en combinación con el adyacente a 3' aproximadamente 19 nucleótidos son sitios objetivo potenciales de ARNpi. En una realización, los sitios objetivo de ARNpi no están preferentemente situados en las regiones 5' y 3' no traducidas (las UTR) o regiones cercanas al codón de inicio (dentro de aproximadamente 75 bases), ya que las proteínas que se unen a regiones reguladoras pueden interferir con el enlazamiento del complejo ARNpi endonucleasa (Elshabir, S. et al. Nature 411: 494 - 498 (2001); Elshabir, S. et al. EMBO J. 20: 6877 - 6888 (2001)). Además, los posibles sitios objetivo pueden ser comparados con una base de datos apropiada del genoma, tal como BLASTN 2.0.5, disponible en el servidor de NCBI en [www.ncbi.nlm](http://www.ncbi.nlm), y potenciales secuencias objetivo con homología significativa con otras secuencias de codificación eliminadas.
- 20 En realizaciones particulares, los ARN de horquilla corta constituyen el componente de ácido nucleico de las partículas lipídicas - ácido nucleico de la presente invención. El ARN de horquilla corta (ARNhc) es una forma de ARN de horquilla capaz de reducir específicamente la expresión de la secuencia de un gen objetivo. Los ARN de horquilla corta pueden ofrecer una ventaja sobre los ARNpi en la supresión de la expresión génica, ya que son generalmente más estables y menos susceptibles a la degradación en el medio ambiente celular. Se ha establecido que el silenciamiento génico mediado por ARN de horquilla corta funciona en una variedad de líneas celulares de cáncer y normales, y en células de mamífero, incluyendo células de ratón y humanas. Paddison, P. et al., Genes Dev. 16 (8): 948 - 58 (2002). Por otra parte, se han generado las líneas celulares transgénicas que portan genes cromosómicos que codifican para los ARNhc modificados por ingeniería genética. Estas células son capaces de sintetizar constitutivamente los ARNhc, facilitando de esta manera el silenciamiento de genes constitutivos o de larga duración que puede ser transmitido a las células descendientes. Paddison, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 99 (3): 1443 - 1448 (2002).
- 25 Los ARNhc contienen una estructura de bucle tallo. En ciertas realizaciones, pueden contener longitudes de tallo variables, típicamente del 19 al 29 nucleótidos de longitud, o cualquier cantidad entre estos dos valores. En ciertas realizaciones, las horquillas contienen 19 a 21 nucleótidos en los tallos, mientras que en otras formas de realización, las horquillas contienen 27 a 29 nucleótidos en los tallos. En ciertas realizaciones, el tamaño de bucle está entre 4 a 23 nucleótidos de longitud, aunque el tamaño de bucle puede ser mayor a 23 nucleótidos sin afectar significativamente la actividad de silenciamiento. Moléculas de ARNhc pueden contener faltas de correspondencia, por ejemplo faltas de correspondencia de G-U entre las dos cadenas del tallo del ARNhc sin disminuir la potencia. De hecho, en ciertas realizaciones, los ARNhc están diseñados para incluir uno o varios emparejamiento G-U en el tallo de la horquilla para estabilizar las horquillas durante la propagación en bacterias, por ejemplo. Sin embargo, se requiere típicamente la complementariedad entre la porción del tallo que se une al ARNm objetivo (cadena antisentido) y el ARNm, e incluso una sola falta de correspondencia de un solo par de bases en esta región puede suprimir el silenciamiento. No se requiere que haya nucleótidos que sobresalgan en 5' y 3', ya que no parecen ser críticos para la función de ARNhc, aunque pueden estar presentes (Paddison et al. (2002) Genes & Dev. 16 (8): 948 - 58).
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50 Los microARN
- Los micro ARN (miARN) son una clase altamente conservada de moléculas de ARN pequeñas que se transcriben a partir del ADN en los genomas de plantas y animales, pero no se traducen en proteína. Los miARN procesados son moléculas de ARN monocatenario de ~ 17 - 25 nucleótidos (nt) que se incorporan en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y que han sido identificados como los principales reguladores del desarrollo, la proliferación celular, la apoptosis y la diferenciación. Se cree que ellos desempeñan un papel en la regulación de la expresión génica mediante el enlazamiento a la región 3' no traducida de los ARNm específicos. RISC media la subregulación de la expresión génica a través de inhibición de la traducción, escisión del transcripto, o ambos. RISC también está implicado en el silenciamiento transcripcional en el núcleo de una amplia gama de eucariotas.
- 55

El número de secuencias de miARN identificadas hasta la fecha es grande y creciente, ejemplos ilustrativos de las cuales se pueden encontrar, por ejemplo, en: Griffiths-Jones S, et al. NAR, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; Griffiths-Jones S. NAR, 2004, 32, Database Issue, D109-D111, y también en <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>.

## 5 Oligonucleótidos antisentido

En una realización, un ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido dirigido a un polinucleótido objetivo. El término "oligonucleótido antisentido" o simplemente "antisentido" se entiende que incluye oligonucleótidos que son complementarios a una secuencia de polinucleótido objetivo. Los oligonucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarias a una secuencia seleccionada. En el caso de ARN antisentido, impiden la traducción de cadenas de ARN complementarias mediante la unión con ellas. Se puede utilizar ADN antisentido para apuntar a un ARN complementario específico (de codificación o no codificante). Si la unión tiene lugar, este híbrido de ADN / ARN puede ser degradado por la enzima ARNasa H. En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido contienen aproximadamente desde 10 hasta aproximadamente 50 nucleótidos, más preferiblemente aproximadamente desde 15 hasta aproximadamente 30 nucleótidos. El término también abarca oligonucleótidos antisentido que pueden no ser exactamente complementarios al gen objetivo deseado. Por lo tanto, la invención se puede utilizar en casos en los que se encuentran actividades específicas no objetivo con antisentido, o donde una secuencia antisentido que contiene una o más faltas de correspondencia con la secuencia objetivo es lo más preferido para un uso particular.

Los oligonucleótidos antisentido han demostrado ser inhibidores efectivos y susceptibles de direccionamiento de la síntesis de proteínas, y, en consecuencia, se puede utilizar para inhibir la síntesis de proteínas por un gen objetivo. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la síntesis de proteínas está bien establecida. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y del receptor de acetilcolina tipo 2 de musarina son inhibidas por los oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus secuencias de ARNm respectivas (patente de los Estados Unidos No. 5.739.119 y la patente de los Estados Unidos No. 5.759.829). Además, los ejemplos de inhibición antisentido se han demostrado con la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABA<sub>A</sub> estriatal y EGF humano (Jaskulski et al., *Science*. 1988, 10 de junio, 240 (4858): 1544 - 6; Vasanthakumar y Ahmed, *Cancer Commun*. 1989; 1 (4): 225 - 32; Peris et al., *Brain Res. Mol. Brain Res*. 1998, 15 de junio; 57 (2): 310 - 20; patente de los Estados Unidos No. 5.801.154; patente de los Estados Unidos No. 5.789.573; patente de los Estados Unidos No. 5.718.709 y la patente de los Estados Unidos No. 5.610.288). Además, también se han descrito constructos antisentido que inhiben y pueden usarse para tratar una variedad de proliferaciones celulares anormales, por ejemplo, cáncer (patente de los Estados Unidos No. 5.747.470, patente de los Estados Unidos No. 5.591.317 y patente de los Estados Unidos No. 5.783.683).

Los métodos de producción de oligonucleótidos antisentido son conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para producir un oligonucleótido antisentido que se dirige a cualquier secuencia de polinucleótidos. La selección de secuencias de oligonucleótidos antisentido específicas para una secuencia objetivo dada se basa en el análisis de la secuencia objetivo elegida y en la determinación de la estructura secundaria,  $T_m$ , la energía de enlace, y la estabilidad relativa. Los oligonucleótidos antisentido se pueden seleccionar con base en su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm objetivo en una célula huésped. Las regiones objetivo altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm. Estos análisis de la estructura secundaria y las consideraciones de selección del sitio objetivo se puede realizar, por ejemplo, usando la versión v.4 del software de análisis del cebador OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el software del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res*. 1997, 25 (17): 3389 - 402).

## 45 Ribozimas

De acuerdo con otra realización de la invención, las partículas lipídicas - ácido nucleico están asociadas con ribozimas. Los ribozimas son complejos de ARN-proteína que tiene dominios catalíticos específicos que poseen actividad de endonucleasa (Kim y Cech, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1987, Dic.; 84 (24): 8788 - 92; Forster y Symons, *Cell*. 1987, 24 de abril; 49 (2): 211 - 20). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, a menudo escindiendo únicamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (Cech et al., *Cell*. 1981, Dic., 27 (3 Pt2): 487 - 96; Michel y Westhof, *J Mol Biol*. 1990, 5 de diciembre; 216 (3): 585 - 610; Reinhold-Hurek y Shub, *Nature*. 1992, 14 de mayo; 357 (6374): 173 - 6). Esta especificidad se ha atribuido al requisito de que el sustrato se una a través de interacciones específicas de apareamiento de bases a la secuencia interna de guía ("IGS") del ribozima antes de la reacción química.

Al menos seis variedades básicas de los ARN enzimáticos de origen natural se conocen actualmente. Cada una puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN en posición trans (y por lo tanto pueden escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan primero

enlazándose a un ARN objetivo. Tal enlace se produce a través de la porción de enlazamiento objetivo de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN objetivo. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y después se enlaza a un ARN objetivo a través del apareamiento de bases complementarias, y una vez enlazado al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN objetivo. La escisión estratégica de tal ARN objetivo destruirá su capacidad de síntesis directa de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático ha enlazado y escindido su ARN objetivo, se libera de ese ARN para buscar otro objetivo y puede enlazarse en repetidas ocasiones y escindir nuevos objetivos.

La molécula de ácido nucleico enzimática puede tener la forma de una cabeza de martillo, horquilla, del virus  $\delta$  de la hepatitis, de un intrón del grupo I o de ARN de ARNasa P (junto con una secuencia guía de ARN) o motivo de ARN de *Neurospora VS*, por ejemplo. Ejemplos específicos de motivos de cabeza de martillo son descritos por Rossi et al., *Nucleic Acids Res.* 1992, 11 de septiembre; 20 (17): 4559 - 65. Ejemplos de motivos de horquilla son descritos por Hampel et al. (publicación de la solicitud de patente europea No. EP 0360257), Hampel y Tritz, *Biochemistry*, 1989, 13 de junio; 28 (12): 4929 - 33; Hampel et al., *Nucleic Acids Res.* 1990, 25 de enero; 18 (2): 299 - 304 y la patente de los Estados Unidos No. 5.631.359. Un ejemplo del motivo de virus  $\delta$  de la hepatitis es descrito por Perrotta y Been, *Biochemistry*. 1992, 1 de diciembre; 31 (47): 11843 - 52; un ejemplo del motivo de ARNasa P es descrito por Guerrier-Takada et al., *Cell*. 1983, diciembre, 35 (3 Pt 2): 849 - 57; un motivo de ribozima de ARN de *Neurospora VS* es descrito por Collins (Saville y Collins, *Cell*. 1990, 18 de mayo; 61 (4): 685 - 96; Saville y Collins, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU.* 1991, 1 de octubre, 88 (19): 8826 - 30; Collins y Olive, *Biochemistry*. 1993, 23 de marzo; 32 (11): 2795 - 9), y un ejemplo de un intrón del Grupo I es descrito en la patente de los Estados Unidos No. 4.987.071. Las características importantes de moléculas de ácido nucleico enzimáticas usadas de acuerdo con la invención son que tienen un sitio de enlazamiento específico del sustrato que es complementario a una o más de las regiones de ADN o ARN del gen objetivo, y que tienen secuencias de nucleótidos dentro o alrededor de ese sitio de enlazamiento del sustrato que imparte una actividad de escisión de ARN a la molécula. Por lo tanto, los constructos de ribozima no necesitan limitarse a motivos específicos mencionados en el presente documento.

Los métodos para producir una ribozima dirigida a cualquier secuencia de polinucleótidos son conocidos en la técnica. Los ribozimas pueden ser diseñados como se describe en la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 93/23569 y en la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 94/02595, y sintetizados para ser probados *in vitro* e *in vivo*, como se describe en las mismas.

La actividad de los ribozimas se puede optimizar mediante la alteración de la longitud de los brazos de enlazamiento del ribozima o sintetizando químicamente ribozimas con modificaciones que impidan su degradación por ribonucleasas del suero (véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 92/07065; la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 93/15187; la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 91/03162; la publicación de la solicitud europea de patente No. 92110298.4; la patente de los Estados Unidos No. 5.334.711; y la publicación de la solicitud internacional de patente No. WO 94/13688, que describen diversas modificaciones químicas que se pueden hacer a las fracciones de azúcar de moléculas de ARN enzimáticas), modificaciones que mejoran su eficacia en células, y la eliminación de las bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis de ARN y reducir los requisitos químicos.

#### Oligonucleótidos estimuladores del sistema inmunológico

Los ácidos nucleicos asociados con partículas lipídicas de la presente invención pueden ser estimuladores del sistema inmunológico, incluyendo oligonucleótidos estimuladores del sistema inmunológico (ISS; mono o bicatenarios) capaces de inducir una respuesta inmune cuando se administran a un sujeto, que puede ser un mamífero u otro paciente. Los ISS incluyen, por ejemplo, ciertos palíndromos que conducen a estructuras secundarias de horquilla (véase Yamamoto S., et al. (1992) *J. Immunol.* 148: 4.072 - 4.076), o motivos CpG, así como otras características conocidas de los ISS (tales como los dominios multi-G, véase el documento WO 96/11266).

La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune adaptativa o innata. El sistema inmune se divide en un sistema inmune más innato, y un sistema inmune adaptativo adquirido de vertebrados, donde este último se divide en componentes celulares humorales. En realizaciones particulares, la respuesta inmune puede ser la mucosa.

En realizaciones particulares, un ácido nucleico estimulador del sistema inmunológico es sólo estimulador del sistema inmunológico cuando se administra en combinación con una partícula lipídica, y no es estimulador del sistema inmunológico cuando se administra en su "forma libre". De acuerdo con la presente invención, tal oligonucleótido se considera que es estimulador del sistema inmunológico.

Ácidos nucleicos estimuladores del sistema inmunológico se considera que no son específicos de una secuencia cuando no se requiere que se unan específicamente a, y reduzcan la expresión de un polinucleótido objetivo con el fin de provocar una respuesta inmune. Por lo tanto, ciertos ácidos nucleicos estimuladores del sistema inmunológico

pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen de origen natural o ARNm, pero aún se pueden considerar no específicos de una secuencia de ácidos nucleicos estimuladores del sistema inmunológico.

5 En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico comprende al menos un dinucleótido CpG. El oligonucleótido o dinucleótido CpG puede estar metilado o no metilado. En otra realización, el ácido nucleico estimulador del sistema inmunológico comprende al menos un dinucleótido CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un solo dinucleótido CpG, en donde la citosina en dicho dinucleótido CpG está metilado. En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3' (SEQ ID NO: 2). En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos CpG, en donde al menos una citosina en los dinucleótidos CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina en los dinucleótidos CpG presentes en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende una pluralidad de dinucleótidos CpG, en donde al menos uno de dichos dinucleótidos CpG comprende una citosina metilada. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de oligonucleótidos estimuladores del sistema inmunológico.

15 En una forma de realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5' TTCCATGACGTTCTGACGT 3' (SEQ ID NO: 1). En otra realización específica, la secuencia de ácido nucleico comprende la secuencia 5' TCCATGACGTTCTGACGT 3' (SEQ ID NO: 31), en donde las dos citosinas indicadas en negrita están metiladas. En realizaciones particulares, el ODN se selecciona de un grupo de los ODN que consiste de ODN # 1, ODN # 2, ODN # 3, ODN # 4, ODN # 5, ODN # 6, ODN # 7, ODN # 8, y ODN # 9, como se muestra a continuación.

Tabla 1. Ejemplos de oligonucleótidos estimuladores del sistema inmunológico (los ODN)

Nombre del ODN	ODN SEQ ID NO	Secuencia del ODN (5' - 3')
ODN 1 (INX-6295) c-myc humana	SEQ ID NO: 2	5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m (INX-6303)	SEQ ID NO: 4	5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2 (INX-1826)	SEQ ID NO: 1	5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3
* ODN 2m (INX-1826m)	SEQ ID NO: 31	5'-TCCATGAZGTTCTGAGZGTT-3
ODN 3 (INX-6300)	SEQ ID NO: 3	5'-TAAGCATACGGGGTGT-3
ODN 5 (INX-5001)	SEQ ID NO: 5	5'-AACGTT-3
ODN 6 (INX-3002)	SEQ ID NO: 6	5'-GATGCTGTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
ODN 7 (INX-2006)	SEQ ID NO: 7	5'-TCGTCGTTTTGTGTTTTGTGTT-3'
ODN 7m (INX-2006m)	SEQ ID NO: 32	5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ODN 8 (INX-1982)	SEQ ID NO: 8	5'-TCCAGGACTTCTCAGGTT-3'
ODN 9 (INX-G3139)	SEQ ID NO: 9	5'-TCTCCCAGCGTGCCCAT-3'
ODN 10 (PS-3082) Molécula 1 de adhesión intracelular de múrido	SEQ ID NO: 10	5'-TGCATCCCCAGGCCACCAT-3
ODN 11 (PS-2302) Molécula 1 de adhesión intracelular humana	SEQ ID NO: 11	5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 12 (PS-8997) Molécula 1 de adhesión intracelular humana	SEQ ID NO: 12	5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 13 (US3) erb-B-2 humana	SEQ ID NO: 13	5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ODN 14 (LR-3280) c-myc humana	SEQ ID NO: 14	5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 15 (LR-3001) c-myc humana	SEQ ID NO: 15	5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ODN 16 (Inx-6298)	SEQ ID NO: 16	5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'
ODN 17 (hIGF-1R) Receptor del factor 1 de crecimiento de insulina humana	SEQ ID NO: 17	5'-GGACCCTCCTCCGGAGCC-3'
ODN 18 (LR-52) Receptor del factor 1 de crecimiento de insulina humana	SEQ ID NO: 18	5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
ODN 19 (hEGFR) Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano	SEQ ID NO: 19	5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'

20

(continuación)

Nombre del ODN	ODN SEQ ID NO	Secuencia del ODN (5' - 3')
ODN 20 (EGFR) Receptor del factor de crecimiento epidérmico	SEQ ID NO: 20	5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
ODN 21 (hVEGF) Factor de crecimiento endotelial vascular humano	SEQ ID NO: 21	5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
ODN 22 (PS-4189) □ Fosfoquinasa C – alfa de múdo	SEQ ID NO: 22	5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ODN 23 (PS-3521)	SEQ ID NO: 23	5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
ODN 24 (hBcl-2) Bcl-2 humano	SEQ ID NO: 24	5'-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 25 (hC-Raf-1) C-Raf-s humano	SEQ ID NO: 25	5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
ODN #26 (hVEGF-R1) Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular humano	SEQ ID NO: 26	5'-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAAAGUC UG-3'
ODN #27	SEQ ID NO: 27	5'-RRCGYY-3'
ODN # 28 (INX-3280)	SEQ ID NO: 28	5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN #29 (INX-6302)	SEQ ID NO: 29	5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'
Nombre del ODN	ODN SEQ ID NO	Secuencia del ODN (5' - 3')
ODN #30 (INX-6298) c-myc humana	SEQ ID NO: 30	5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'
· "Z" representa un residuo de citosina metilado		
· Nota: ODN 14 es un oligonucleótido de 15-mer y ODN 1 es el mismo oligonucleótido que tiene una timidina añadida sobre el extremo 5' haciendo a ODN 1 en un 16-mer. No se ha detectado diferencia en actividad biológica entre ODN 14 y ODN 1 y ambos exhiben similar actividad estimuladora del sistema inmunológico (Mui et al., J Pharmacol. Exp. Ther. 298: 1185 - 1192 (2001)).		

- 5 Secuencias adicionales de ácido nucleico específicas de oligonucleótidos (los ODN) adecuadas para uso en las composiciones y métodos de la invención se describen en la solicitud de patente de los Estados Unidos con serial No. 60/379.343, en la solicitud de patente de los Estados Unidos con serial No. 09/649.527, en la publicación internacional No. WO 02/069369, en la publicación internacional No. WO 01/15726, en la patente de los Estados Unidos No. 6.406.705, y en Raney et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 298: 1185 - 1192 (2001). En ciertas realizaciones, los ODN usados en las composiciones y métodos de la presente invención tienen una cadena principal de fosfodiéster ("PO") o una cadena principal de fosforotioato ("PS"), y / o al menos un residuo de citosina metilada en un motivo CpG.

#### Modificaciones del ácido nucleico

- 15 En la década de 1990, los oligodesoxinucleótidos antisentido basados en ADN (ODN) y los ribozimas (ARN) representaron un nuevo paradigma emocionante para el diseño y desarrollo de fármacos, pero su aplicación *in vivo* fue impedido por la actividad de endo y exo-nucleasas, así como la falta de suministro intracelular exitoso. El problema de la degradación fue superado eficazmente después de una amplia investigación sobre las modificaciones químicas que impedían que los fármacos de oligonucleótido (oligo) fueran reconocidos por las enzimas nucleasa pero no inhibieron su mecanismo de acción. Esta investigación tuvo tanto éxito que los fármacos ODN antisentido en desarrollo hoy en día permanecen intactos *in vivo* durante días en comparación con minutos para las moléculas no modificadas (Kurreck, J. 2003, Eur J Biochem 270: 1628 - 44). Sin embargo, los problemas del suministro intracelular y el mecanismo de acción han limitado hasta ahora los ODN antisentido y los ribozimas para que se conviertan en productos clínicos.

Los dúplex de ARN son inherentemente más estables a las nucleasas que el ADN o el ARN monocatenarios, y a diferencia del ODN antisentido, el ARNpi sin modificar muestra una buena actividad una vez que acceden al

citoplasma. Aun así, las modificaciones químicas desarrolladas para estabilizar el ODN antisentido y los ribozimas también se han aplicado sistemáticamente al ARNpi para determinar cuánta modificación química puede ser tolerada y si la actividad farmacocinética y farmacodinámica se pueden mejorar. La ribointerferencia por ARNpi dúplex requiere una cadena sentido y una antisentido, las cuales tienen diferentes funciones. Ambas son necesarias para que el ARNpi entre en RISC, pero una vez cargadas las dos cadenas se separan y la cadena sentido se degrada mientras que la cadena antisentido permanece para guiar RISC al ARNm objetivo. La entrada en RISC es un proceso que es estructuralmente menos estricto que el reconocimiento y la escisión del ARNm objetivo. En consecuencia, son posibles muchas modificaciones químicas diferentes de la cadena sentido, pero sólo cambios limitados son tolerados por la cadena antisentido.

Como es conocido en la técnica, un nucleósido es una combinación base - azúcar. Los nucleótidos son nucleósidos que incluyen además un grupo fosfato unido covalentemente a la porción azúcar del nucleósido. Para aquellos nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosilo, el grupo fosfato puede estar enlazado ya sea a la fracción hidroxilo 2', 3' o 5' del azúcar. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazan covalentemente nucleósidos adyacentes entre sí para formar un compuesto polimérico lineal. A su vez, los respectivos extremos de esta estructura polimérica lineal se pueden unir adicionalmente para formar una estructura circular. Dentro de la estructura del oligonucleótido, los grupos fosfato son comúnmente conocidos como los que forman la cadena principal de internucleósidos del oligonucleótido. El enlace normal o la cadena principal de ARN y ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

El ácido nucleico que se utiliza en una partícula lipídica que contiene ácido nucleico de acuerdo con esta invención incluye cualquier forma de ácido nucleico que se conozca. Por lo tanto, el ácido nucleico puede ser un ácido nucleico modificado del tipo utilizado previamente para mejorar la resistencia a la nucleasa y la estabilidad en suero. Sorprendentemente, sin embargo, los productos terapéuticos aceptables pueden ser preparados también usando el método de la invención para formular las partículas lipídicas - ácido nucleico a partir de ácidos nucleicos que no tienen ninguna modificación con los enlaces fosfodiéster de polímeros de ácidos nucleicos naturales, y el uso de ácidos nucleicos fosfodiéster sin modificar (es decir, ácidos nucleicos en los que todos los enlaces son enlaces fosfodiéster) es una forma de realización preferida de la invención.

#### a. Modificaciones de la cadena principal

Un ARNpi antisentido, y otros oligonucleótidos útiles en esta invención incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces entre nucleósidos no naturales. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y aquellos que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. Los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal entre nucleósidos también pueden ser considerados oligonucleósidos. Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquil fosfotriésteres, fosfonato de metilo y otros fosfonatos de alquilo incluyendo fosfonatos 3'-alquileo y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquil fosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, fosforoselenato, metilfosfonato, o enlaces O-alquil fosfotriéster, y boranofosfatos que tienen enlaces 3' - 5' normales, análogos de estos enlazados 2'-5', y aquellos que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósido están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. Los ejemplos particulares no limitantes de modificaciones particulares que pueden estar presentes en un ácido nucleico de acuerdo con la presente invención se muestran en la Tabla 2.

También se incluyen diferentes sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de los enlaces anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 3.687.808; 4.469.863; 4.476.301; 5.023.243; 5.177.196; 5.188.897; 5.264.423; 5.276.019; 5.278.302; 5.286.717; 5.321.131; 5.399.676; 5.405.939; 5.453.496; 5.455.233; 5.466.677; 5.476.925; 5.519.126; 5.536.821; 5.541.306; 5.550.111; 5.563.253; 5.571.799; 5.587.361 y 5.625.050.

En ciertas realizaciones, cadenas principales de oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en ella tienen cadenas principales que se forman por alquilo de cadena corta o enlaces entre nucleósidos cicloalquilo, heteroátomos mixtos y alquilo o enlaces internucleosídicos de cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósidos heterocíclicos o heteroatómicos de cadena corta. Estos incluyen, por ejemplo, los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales de metileno formacetilo y tioformacetilo; 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 otras que tienen N, O, S mezclados y partes componentes de CH<sub>2</sub>. Las patentes representativas de Estados Unidos que describen los oligonucleósidos anteriores incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.034.506; 5.166.315; 5.185.444; 5.214.134; 5.216.141; 5.235.033; 5.264.562; 5.264.564; 5.405.938; 5.434.257; 5.466.677; 5.470.967; 5.489.677; 5.541.307; 5.561.225;

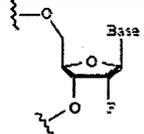
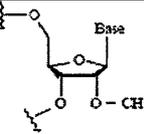
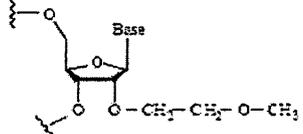
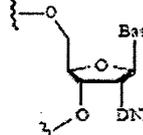
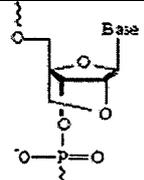
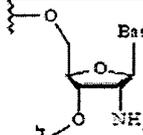
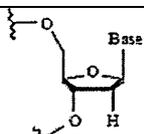
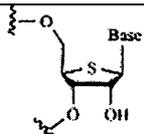
5.596.086; 5.602.240; 5.610.289; 5.602.240; 5.608.046; 5.610.289; 5.618.704; 5.623.070; 5.663.312; 5.633.360; 5.677.437; y 5.677.439.

5 La modificación de la cadena principal de fosforotioato (Tabla 2, # 1), donde un oxígeno que no forma puente en el enlace fosfodiéster se sustituye por azufre, es uno de los medios primeros y más comunes desplegados para estabilizar fármacos de ácido nucleico contra la degradación por nucleasas. En general, parece que las modificaciones de PS se pueden hacer ampliamente para ambas cadenas de ARNpi sin mucho impacto en la actividad (Kurreck, J., Eur. J. Biochem. 270: 1628 - 44, 2003). Sin embargo, los oligos PS son conocidos por asociarse con avidez en forma no específica con las proteínas que resultan en toxicidad, especialmente tras la administración intravenosa. Por lo tanto, la modificación de PS generalmente se limita a una o dos bases en los extremos 3' y 5'.  
10 El enlazador de boranofosfato (Tabla 2, # 2) es una modificación reciente que es aparentemente más estable que PS, mejora la actividad de ARNpi y tiene baja toxicidad (Hall et al., Nucleic Acids Res. 32: 5991 - 6000, 2004).

Tabla 2. Modificaciones químicas aplicadas al ARNpi y otros ácidos nucleicos

#	Abreviatura	Nombre	Sitio de la modificación	Estructura
1	PS	Fosfortioato	Cadena principal	
2	PB	Boranofosfato	Cadena principal	
3	N3-MU	N3-metil-uridina	Base	
4	5'-BU	5'-bromo-uracilo	Base	
5	5'-IU	5'-iodo-uracilo	Base	
6	2,6-DP	2,6-diaminopurina	Base	

(continuación)

#	Abreviatura	Nombre	Sitio de la modificación	Estructura
7	2'-F	2'-Fluoro	Azúcar	
8	2'-OME	2'-O-metilo	Azúcar	
9	2'-O-MOE	2'-O-(2-metoxietilo)	Azúcar	
10	2'-DNP	2'-O-(2,4-dinitrofenilo)	Azúcar	
11	LNA	Ácido nucleico bloqueado (puente de metileno que conecta el 2'-oxígeno con el 4'-carbono del anillo de ribosa)	Azúcar	
12	2'-Amino	2'-Amino	Azúcar	
13	2'-Desoxi	2'-Desoxi	Azúcar	
14	4'-tio	4'-tio-ribonucleótido	Azúcar	

5 Otros derivados de ácidos nucleicos útiles incluyen aquellas moléculas de ácidos nucleicos en las que los átomos de oxígeno que forman puentes (aquellos que forman los enlaces fosfoéster) han sido reemplazados con -S-, -NH-, -CH<sub>2</sub>- y similares. En ciertas realizaciones, las alteraciones en el ARNpi antisentido, u otros ácidos nucleicos utilizados no afectarán completamente las cargas negativas asociadas con los ácidos nucleicos. Por lo tanto, la presente invención contempla el uso de ARNpi antisentido, y otros ácidos nucleicos en los que una porción de los

enlaces se sustituyen, por ejemplo, con el fosfonato de metilo neutro o enlaces fosforamidato. Cuando se utilizan enlaces neutros, en ciertas realizaciones, menos del 80% de los enlaces de ácido nucleico están tan sustituidos, o menos del 50% de los enlaces están tan sustituidos.

#### b. Modificaciones de bases

- 5 Las modificaciones de bases son menos comunes que las de la cadena principal y el azúcar. Las modificaciones mostradas en 0,3-6 todas parecen estabilizar al ARNpi frente a las nucleasas y tienen poco efecto sobre la actividad (Zhang, H. Y., et al., *Curr Top Med. Chem.* 6: 893 - 900 (2006)).

10 Por consiguiente, los oligonucleótidos pueden incluir también modificaciones o sustituciones de nucleobases (a menudo denominadas en la técnica simplemente como "bases"). Tal como se usa en el presente documento, nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases púricas adenina (A) y guanina (G), y la bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales tales como 5-metilcitosina (5-me-C o m5c), 5-hidroximetil citosina, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquilo de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, 5-propinil uracilo y citosina, 6-azo uracilo, citosina y 15 timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidos en posición 8, 5-halo particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en posición 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8 - azaadenina, 7-desazaguanina y 7-desazaadenina y 3-desazaguanina y 3 - desazaadenina.

20 Ciertas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de enlazamiento de los compuestos oligoméricos de la invención, incluyendo pirimidinas sustituidas en posición 5, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del dúplex de ácido nucleico en 0,6 - 1,2 °C. (Sanghvi, Y. S., Crooke, S. T. y Lebleu, B., eds., *Antisense Research and Applications* 1993, CRC Press, Boca Raton, páginas 276 - 278). Estas se pueden combinar, en realizaciones particulares, con modificaciones de azúcar 2'-O-metoxietilo. Las 25 patentes de los Estados Unidos que enseñan la preparación de algunas de estas nucleobases modificadas, así como otras nucleobases modificadas incluyen, pero no se limitan a, las anteriormente mencionadas patente de los Estados Unidos No. 3.687.808, así como la las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.845.205; 5.130.302; 5.134.066; 5.175.273; 5.367.066; 5.432.272; 5.457.187; 5.459.255; 5.484.908; 5.502.177; 5.525.711; 5.552.540; 5.587.469; 5.594.121; 5.596.091; 5.614.617 y 5.681.941.

#### 30 c. Modificaciones del azúcar

La mayoría de modificaciones en el grupo azúcar se producen en el 2'-OH del anillo de azúcar del ARN, que proporciona un sitio químicamente reactivo conveniente (Manoharan, M., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 570 - 9 (2004); Zhang, H. Y., et al., *Curr. Top. Med. Chem.* 6: 893 - 900 (2006)). La 2'-F y la 2'-OMe son comunes y ambas 35 aumentan la estabilidad, la modificación 2'-OMe no reduce la actividad con tal que se limite a menos de 4 nucleótidos por cada cadena (Holen, T., et al., *Nucleic Acids Res.* 31: 2401 - 7 (2003)). La 2'-O-MOE es más efectiva en ARNpi cuando las bases modificadas están restringidas a la región media de la molécula (Prakash, T. P., et al., *J. Med. Chem.* 48: 4247 - 53 (2005)). Otras modificaciones que se ha encontrado que estabilizan el ARNpi sin pérdida de actividad se muestran en la Tabla 2, 10 - 14.

40 Los oligonucleótidos modificados también pueden contener una o más fracciones de azúcar sustituidas. Por ejemplo, la invención incluye oligonucleótidos que comprenden una de las siguientes en la posición 2': OH; F; O-, -S-alquilo o N-alquilo, O-alquil-O-alquilo, O-, S-, o N-alquenilo, u O-, S- o N-alquinilo, en donde el alquilo, alquenilo y alquinilo pueden ser alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub> o alquenilo y alquinilo C<sub>2</sub> a C<sub>10</sub> sustituidos o no sustituidos. Particularmente preferidos son O[(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O]<sub>m</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>OCH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>, O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ONH<sub>2</sub>, y O(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>ON [(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>3</sub>]<sub>2</sub>, donde n y m son de 1 hasta aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno 45 de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C<sub>1</sub> a C<sub>10</sub>, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH<sub>3</sub>, OCN, Cl, Br, CN, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, ONO<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>, NH<sub>2</sub>, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo reportero, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tienen propiedades 50 similares. Una modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>, también conocido como 2'-O-(2-metoxietilo) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486 - 504), es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otras modificaciones incluyen 2'-dimetilaminooxietoxi, es decir, un grupo O(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>ON(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, también conocido como 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE).

55 Modificaciones adicionales incluyen 2'-metoxi (2'-O-CH<sub>3</sub>), 2'-aminopropoxi (2'-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>) y 2'-fluoro (2'-F). Modificaciones similares pueden hacerse también en otras posiciones sobre el oligonucleótido, particularmente la posición 3' del azúcar sobre el nucleótido del terminal 3' o en oligonucleótidos con enlaces 2' - 5' y la posición 5' del

nucleótido del terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcar tales como fracciones de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosilo. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcares modificados incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 4.981.957; 5.118.800; 5.319.080; 5.359.044; 5.393.878; 5.446.137; 5.466.786; 5.514.785; 5.519.134; 5.567.811; 5.576.427; 5.591.722; 5.597.909; 5.610.300; 5.627.053; 5.639.873; 5.646.265; 5.658.873; 5.670.633 y 5.700.920.

En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleosídico, es decir, la cadena principal, de las unidades de nucleótidos se reemplazan con grupos nuevos, aunque las unidades de las bases se mantienen para la hibridación con un compuesto objetivo de ácido nucleico apropiado. Uno de tales compuestos oligoméricos, un mimético de oligonucleótido que ha demostrado tener excelentes propiedades de hibridación, se conoce como un ácido nucleico peptídico (PNA). En los compuestos PNA, la cadena principal del azúcar de un oligonucleótido se reemplaza con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y se enlazan directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amida de la cadena principal. Las patentes de Estados Unidos representativas que enseñan la preparación de compuestos PNA incluyen, pero no se limitan a, las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Además, la enseñanza de compuestos PNA se puede encontrar en Nielsen et al., Science 254, 1497 - 1500 (1991).

Las realizaciones particulares de la invención son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales de heteroátomos, y en particular --CH<sub>2</sub>--NH--O--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--O--CH<sub>2</sub>-- (conocido como un metileno (metilimino) o columna vertebral MMI) --CH<sub>2</sub>--O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--, --CH<sub>2</sub>--N(CH<sub>3</sub>)--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>-- y --O--N(CH<sub>3</sub>)--CH<sub>2</sub>--CH<sub>2</sub>-- (en donde la cadena principal de fosfodiéster nativo se representa como --O--P--O--CH<sub>2</sub>--) de la patente de los Estados Unidos No. 5.489.677 anteriormente referenciada, y las cadenas principales de amida de la patente de los Estados Unidos No. 5.602.240 anteriormente referenciada. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la patente de los Estados Unidos No. 5.034.506 anteriormente referenciada.

#### d. Oligonucleótidos quiméricos

No es necesario para todas las posiciones en un compuesto determinado que sean modificadas uniformemente, y de hecho más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente se pueden incorporar en un único compuesto o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido. Ciertos oligonucleótidos preferidos de esta invención son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de esta invención, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente distintas, cada una compuesta de al menos un nucleótido. Estos oligonucleótidos contienen típicamente al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, un aumento de la resistencia a las nucleasas, un aumento de la captación en las células, un aumento de afinidad de enlazamiento por el ARN objetivo) y una región que es un substrato para la escisión por ARNasa H.

En una realización, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de enlazamiento objetivo. La afinidad de un oligonucleótido por su objetivo se determina de manera rutinaria mediante la medición de la T<sub>m</sub> de un par de oligonucleótidos / objetivo, que es la temperatura a la que se disocian el oligonucleótido y el objetivo; se detecta espectrofotométricamente la disociación. Cuanto mayor la T<sub>m</sub>, mayor será la afinidad del oligonucleótido por el objetivo. En una forma de realización, la región del oligonucleótido que se modifica para aumentar la afinidad de enlazamiento del ARNm objetivo comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, más preferiblemente un nucleótido modificado en 2'-O-alquilo, 2'-O-alquil-O-alquilo o 2'-fluoro. Tales modificaciones se incorporan de forma rutinaria en oligonucleótidos y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una T<sub>m</sub> más alta (es decir, una mayor afinidad de enlazamiento con el objetivo) que 2'-desoxioligonucleótidos contra un objetivo determinado. El efecto de tal aumento de la afinidad es mejorar en gran medida la inhibición del oligonucleótido de la expresión del gen objetivo.

En otra forma de realización, un oligonucleótido quimérico comprende una región que actúa como un substrato para la ARNasa H. Por supuesto, se entiende que los oligonucleótidos pueden incluir cualquier combinación de las diversas modificaciones descritas en el presente documento.

Otra modificación de los oligonucleótidos de la invención implica el enlazamiento químico con el oligonucleótido de una o más fracciones o conjugados que mejoran la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Tales conjugados y métodos de preparación de la misma son conocidos en la técnica.

Aquellos capacitados en la técnica se darán cuenta que para la utilidad *in vivo*, tal como la eficacia terapéutica, una regla de oro razonable es que si una versión con tioato de la secuencia funciona en la forma libre, esas partículas encapsuladas de la misma secuencia, de cualquier química, también serán eficaces. Las partículas encapsuladas también pueden tener un rango más amplio de utilidades *in vivo*, mostrando eficacia en condiciones y modelos que

no se conocían por ser de otra manera sensibles a la terapia antisentido. Aquellos capacitados en la técnica saben que aplicando esta invención puede encontrar modelos antiguos que ahora responden a la terapia antisentido. Además, pueden volver a secuencias o químicas antisentido desechadas y encontrar eficacia mediante el empleo de la invención.

- 5 Los oligonucleótidos utilizados de acuerdo con esta invención se pueden preparar convenientemente y rutinariamente a través de la técnica bien conocida de síntesis en fase sólida. El equipo para dicha síntesis es suministrado por varios proveedores incluyendo Applied Biosystems. Cualquier otro medio para dicha síntesis también se puede emplear; la síntesis real de los oligonucleótidos hace parte de los conocimientos de la persona capacitada en a técnica. También es bien conocido el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos  
10 tales como los fosforotioatos y derivados alquilados.

#### Característica de las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico

- 15 En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a métodos y composiciones para la producción de partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípido en los que los ácidos nucleicos se encapsulan en una capa lipídica. Tales partículas lipídicas que contiene ácido nucleico, que incorporan oligonucleótidos de ARNpi, se caracterizan usando una variedad de parámetros biofísicos que incluyen: (1) la relación de fármaco a lípido; (2) la eficiencia de encapsulación, y (3) el tamaño de partícula. Altas relaciones de fármaco a lípidos, alta eficiencia de encapsulación, buena resistencia a la nucleasa y estabilidad en suero y tamaño de partícula controlable, generalmente de menos de 200 nm de diámetro son deseables. Además, la naturaleza del polímero de ácido  
20 nucleico es de importancia, ya que la modificación de ácidos nucleicos en un esfuerzo para impartir resistencia a la nucleasa se añade al coste de la terapia mientras que en muchos casos proporcionan sólo una resistencia limitada. A menos que se indique lo contrario, estos criterios se calculan en esta memoria descriptiva de la siguiente manera:

- 25 La relación ácido nucleico a lípido es la cantidad de ácido nucleico en un volumen definido de preparación dividido por la cantidad de lípido en el mismo volumen. Esta puede ser en base mol por mol o en base peso por peso, o en base peso por mol. Finalmente, se han empleado formulaciones listas para administración, la relación ácido nucleico: lípido se calcula después de la diálisis, cromatografía y / o digestión enzimática (por ejemplo, una nucleasa) para eliminar la mayor cantidad del ácido nucleico externo como sea posible;

- 30 La eficiencia de la encapsulación se refiere a la relación de fármaco a lípido de la mezcla de partida dividido por la relación de fármaco a lípido de la formulación final competente para administración. Esta es una medida de la eficiencia relativa. Para una medida de la eficiencia absoluta, también se puede calcular la cantidad total de ácido nucleico añadida a la mezcla de partida que termina en la formulación para administración competentes. La cantidad de lípido perdido durante el proceso de formulación también puede ser calculada. La eficiencia es una medida del desperdicio y el costo de la formulación; y

- 35 Tamaño indica el tamaño (diámetro) de las partículas formadas. La distribución de tamaño se puede determinar utilizando la dispersión cuasi-elástica de la luz (QELS) en un medidor del tamaño de partícula por debajo de las micras Nicomp Modelo 370. Se prefieren partículas menores de 200 nm para la distribución a tejidos neo-vascularizados (sujetos a filtraciones), tales como las neoplasias y los sitios de inflamación.

#### Composiciones farmacéuticas

- 40 Las partículas lipídicas de presente invención, en particular cuando están asociadas con un agente terapéutico, se pueden formular como una composición farmacéutica, por ejemplo, que comprende además un diluyente farmacéuticamente aceptable, excipiente, o portador, tal como una solución salina fisiológica o amortiguador de fosfato, seleccionado de acuerdo con la ruta de administración y la práctica farmacéutica estándar.

- 45 En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico de la invención se preparan de acuerdo con técnicas estándar y además comprenden un portador farmacéuticamente aceptable. Generalmente, se empleará solución salina como el portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua amortiguada, solución salina al 0,9%, glicina al 0,3%, y similares, incluyendo glicoproteínas para una mejor estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En composiciones que comprenden solución salina u otros portadores que contienen sal, el portador se añade preferiblemente después de la formación de las partículas lipídicas. Por lo tanto, después de que se forman las composiciones lipídicas que contienen ácido nucleico, las composiciones se pueden  
50 diluir en portadores farmacéuticamente aceptables tales como una solución salina normal.

Las preparaciones farmacéuticas resultantes pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las soluciones acuosas pueden ser luego envasadas para uso o filtradas bajo condiciones asépticas y liofilizadas, siendo la preparación liofilizada combinada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables

según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes para el ajuste del pH y amortiguadores, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Además, la suspensión lipídica puede incluir agentes de protección de los lípidos que protegen los lípidos contra los daños provocados por los radicales libres y la peroxidación de los lípidos durante el almacenamiento. Los inactivadores de radicales libres lipófilos, tales como  $\alpha$ -tocoferol y los quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina, son adecuados.

La concentración de partículas lipídicas o de partícula lipídicas que contienen ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,01%, generalmente a o al menos aproximadamente 0,05 - 5% hasta tanto como 10 a 30% en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, se puede aumentar la concentración para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada a la aterosclerosis o hipertensión grave. Alternativamente, los complejos compuestos de lípidos irritantes pueden diluirse hasta bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el sitio de administración. En un grupo de realizaciones, el ácido nucleico contará con una etiqueta y será utilizado para diagnóstico (mediante la indicación de la presencia de ácido nucleico complementario). En este caso, la cantidad de complejos administrados dependerá de la etiqueta particular usada, el estado de la enfermedad que se diagnostica y el juicio del médico, pero generalmente estará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg / kg de peso corporal.

Como se señaló anteriormente, las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico de la invención pueden incluir fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG), PEG-ceramida, o lípidos modificados con gangliósido  $G_{M1}$  u otros lípidos efectivos para prevenir o evitar la agregación. La adición de tales componentes no se limita a prevenir la agregación compleja. Por el contrario, también puede proporcionar un medio para aumentar el tiempo de vida en circulación y para aumentar el suministro de la composición de lípido - ácido nucleico a los tejidos objetivo.

La presente invención también proporciona composiciones de agente terapéutico en lípido en forma de un kit. El kit típicamente se compone de un contenedor que está dividido en compartimientos para contener los diversos elementos del kit. El kit contendrá las partículas o composiciones farmacéuticas de la presente invención, preferiblemente en forma deshidratada o concentrada, con instrucciones para su rehidratación o dilución y administración. En ciertas realizaciones, las partículas comprenden el agente activo, mientras que en otras formas de realización, no lo hacen.

#### D. Métodos de fabricación

Los métodos y composiciones de la invención hacen uso de ciertos lípidos catiónicos, la síntesis, preparación y caracterización de los cuales se describe a continuación y en los ejemplos adjuntos. Además, la presente invención proporciona métodos de preparación de partículas lipídicas, incluyendo aquellas asociadas con un agente terapéutico, por ejemplo, un ácido nucleico. Generalmente, se puede utilizar cualquier método de preparación de partículas lipídicas que contienen ácido nucleico de acuerdo con la presente invención mediante el uso de uno o más de los lípidos de la presente invención en las partículas lipídicas resultantes que contienen ácido nucleico. Se conocen ejemplos de métodos adecuados en la técnica y se describen, por ejemplo, en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2006/0134189.

En una realización, una mezcla de lípidos se combina con una solución acuosa amortiguada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas lipídicas en el que los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una relación ácido nucleico / lípido de aproximadamente 3% en peso hasta aproximadamente 25% en peso, preferiblemente de 5 a 15% en peso. La mezcla intermedia puede opcionalmente ser de un tamaño para obtener partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípido en donde las porciones de lípidos son vesículas unilamelares, que tiene preferiblemente un diámetro de 30 a 150 nm, más preferiblemente de aproximadamente 40 a 90 nm. El pH se eleva a continuación, para neutralizar al menos una parte de las cargas de superficie sobre las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico, proporcionando así una composición de ácido nucleico encapsulada en lípido al menos parcialmente neutralizada en la superficie.

Como se describió anteriormente, varios de estos lípidos catiónicos son aminolípidos que se cargan a un pH por debajo del  $pK_a$  del grupo amino y son sustancialmente neutros a un pH por encima del  $pK_a$ . Estos lípidos catiónicos se denominan lípidos catiónicos valorables y se pueden utilizar en las formulaciones de la invención usando un proceso de dos etapas. En primer lugar, las vesículas lipídicas se pueden formar en el pH más bajo con lípidos catiónicos valorables y otros componentes de las vesículas en presencia de ácidos nucleicos. De esta forma, las vesículas encapsularán y atraparán los ácidos nucleicos. En segundo lugar, se puede neutralizar la carga superficial de las vesículas recién formadas mediante el aumento del pH del medio hasta un nivel por encima del  $pK_a$  de los lípidos catiónicos valorables presentes, es decir, a pH fisiológico o superior. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría particular, se cree que la muy alta eficacia de la encapsulación de ácido nucleico es el resultado de la interacción electrostática a un pH bajo. A pH ácido (por ejemplo, pH 4,0) la superficie de la vesícula se carga y

enlaza una porción de los ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas. Cuando se intercambia el amortiguador ácido externo por un amortiguador más neutro (por ejemplo, pH 7,5) la superficie de la partícula lipídica o liposoma se neutraliza, permitiendo que cualquier ácido nucleico externo sea removido. Información más detallada sobre el proceso de formulación se proporciona en diversas publicaciones (por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.287.591 y la patente de los Estados Unidos No. 6.858.225). Aspectos particularmente ventajosos de este proceso incluyen tanto la fácil eliminación de cualquier ácido nucleico adsorbido en la superficie como un vehículo de suministro de ácido nucleico resultante, que tiene una superficie neutra. Se espera que los liposomas o partículas lipídicas que tienen una superficie neutra eviten la rápida eliminación de la circulación y eviten cierta toxicidad que está asociada con preparaciones de liposomas catiónicos. Se observa, además, que las vesículas formadas de esta forma proporcionan formulaciones de tamaño de vesícula uniforme con alto contenido de ácidos nucleicos. Además, las vesículas tienen un intervalo de tamaño de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 150 nm, más preferiblemente de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 90 nm. Detalles adicionales relativos a los usos de tales lípidos catiónicos valorables en la formulación de partículas lipídicas que contienen ácido nucleico se proporcionan en la patente de los Estados Unidos No. 6.287.591 y la patente de los Estados Unidos No. 6.858.225.

En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos incluye al menos dos componentes lipídicos: un primer componente aminolípido de la presente invención que se selecciona de entre los lípidos que tienen un  $pK_a$  de tal manera que el lípido es catiónico a pH por debajo del  $pK_a$  y neutro a pH por encima del  $pK_a$ , y un segundo componente lipídico que se selecciona de entre los lípidos que impiden la agregación de partículas durante la formación de partículas lipídicas que contienen ácido nucleico. En realizaciones particulares, el aminolípido es un lípido catiónico novedoso de la presente invención.

En ciertas formas de realización de la preparación de las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico de la invención, la mezcla de lípidos es típicamente una solución de lípidos en un disolvente orgánico. Esta mezcla de lípidos se puede secar para formar una película delgada o liofilizada para formar un polvo antes de ser hidratado con un amortiguador acuoso para formar liposomas. Alternativamente, en un método preferido, la mezcla de lípidos se puede solubilizar en un alcohol miscible en agua, tal como etanol, y esta solución etanólica se añade a un amortiguador acuoso lo que resulta en la formación espontánea de liposomas. En la mayoría de las realizaciones, el alcohol se utiliza en la forma en que se encuentra disponible comercialmente. Por ejemplo, el etanol puede ser utilizado como etanol absoluto (100%), o como etanol al 95%, siendo el resto agua. Este método se describe con más detalle en la patente de los Estados Unidos No. 5.976.567.

En un ejemplo de realización, la mezcla de lípidos es una mezcla de aminolípidos catiónicos, lípidos neutros (distinta de un aminolípido), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA) en un disolvente de alcohol. En ciertas realizaciones, la mezcla de lípidos se compone esencialmente de un aminolípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG en alcohol, más preferiblemente etanol. En ciertas realizaciones, la primera solución consiste en la mezcla de lípidos anterior en proporciones molares de alrededor de 20 - 70% de aminolípidos : 5 - 45% de lípidos neutros : 20 - 55% de colesterol : 0,5 - 15% de lípido modificado con PEG. En otras formas de realización, la primera solución consiste esencialmente de DLin-K-C2-DMA, DSPC, Chol y PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, más preferiblemente en una relación molar de aproximadamente 20 - 60% de DLin-K-C2-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA. En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se reemplaza con POPC, DOPE o SM.

En ciertas formas de realización de acuerdo con la invención, la mezcla de lípidos se combina con una solución acuosa amortiguada que puede contener los ácidos nucleicos. La solución acuosa amortiguada es típicamente una solución en la que el amortiguador tiene un pH por debajo del  $pK_a$  del lípido protonable en la mezcla de lípidos. Ejemplos de amortiguadores adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato, y MES. Un amortiguador particularmente preferido es un amortiguador de citrato. Los amortiguadores preferidos estarán en el rango de 1 - 1000 mM del anión, dependiendo de la química del ácido nucleico que se está encapsulado, y la optimización de la concentración del amortiguador puede ser significativa para el logro de altos niveles de carga (véase, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos No. 6.287.591 y la patente de los Estados Unidos No. 6.858.225). Alternativamente, puede ser útil agua pura acidificada a pH 5 - 6 con cloruro, sulfato o similares. En este caso, puede ser adecuado añadir 5% de glucosa, u otro soluto no iónico que va a equilibrar el potencial osmótico a través de la membrana de partículas cuando las partículas se dializan para eliminar el etanol, aumentar el pH, o se mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable tal como una solución salina normal. La cantidad de ácido nucleico en amortiguador puede variar, pero será típicamente de aproximadamente 0,01 mg / mL hasta aproximadamente 200 mg / mL, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg / mL hasta aproximadamente 50 mg / mL.

La mezcla de lípidos y la solución acuosa amortiguada de ácidos nucleicos terapéuticos se combinan para proporcionar una mezcla intermedia. La mezcla intermedia es típicamente una mezcla de partículas lipídicas que tienen ácidos nucleicos encapsulados. Además, la mezcla intermedia también puede contener una parte de los ácidos nucleicos que están unidos a la superficie de las partículas lipídicas (liposomas o vesículas lipídicas) debido a la atracción iónica de los ácidos nucleicos cargados negativamente y los lípidos cargados positivamente sobre la

superficie de la partícula lipídica (los aminolípidos u otros lípidos que componen el primer componente lípido protonable están cargados positivamente en un amortiguador que tiene un pH por debajo del  $pK_a$  del grupo protonable en el lípido). En un grupo de realizaciones preferidas, la mezcla de lípidos es una solución alcohólica de los lípidos y se ajustan los volúmenes de cada una de las soluciones de modo que tras la combinación, el contenido de alcohol resultante es aproximadamente del 20% en volumen hasta aproximadamente 45% en volumen. El método de combinación de las mezclas puede incluir cualquiera entre una variedad de procesos, a menudo dependiendo de la escala de formulación producida. Por ejemplo, cuando el volumen total es de aproximadamente 10 - 20 mL o menos, las soluciones se pueden combinar en un tubo de ensayo y se agitan juntos usando un mezclador de vórtice. Los procesos a gran escala pueden ser llevados a cabo en cristalería adecuada para la escala de la producción.

Opcionalmente, los complejos del agente terapéutico encapsulado en lípido (por ejemplo, ácido nucleico) que se producen mediante la combinación de la mezcla de lípidos y la solución acuosa amortiguada de agentes terapéuticos (ácidos nucleicos) se puede dimensionar para lograr un intervalo de tamaño deseado y la distribución relativamente estrecha de tamaños de partícula lipídica. Preferiblemente, las composiciones proporcionadas en el presente documento se dimensionarán para un diámetro promedio de aproximadamente 70 hasta aproximadamente 200 nm, más preferiblemente de aproximadamente 90 hasta aproximadamente 130 nm. Varias técnicas están disponibles para el dimensionamiento de los liposomas al tamaño deseado. Un método de dimensionamiento se describe en la patente de los Estados Unidos No. 4.737.323. La sonicación de una suspensión de liposomas, ya sea mediante sonicación en un baño o con sonda produce una reducción de tamaño progresiva hasta vesículas unilamelares pequeñas (las SUV) aproximadamente menores a 0,05 micras de tamaño. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento típico de homogeneización, las vesículas multilamelares se hacen recircular a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños seleccionados de los liposomas, típicamente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micras. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula se puede controlar mediante la determinación del tamaño de partícula mediante un rayo láser convencional. Para ciertos procedimientos en este documento, la extrusión se utiliza para obtener un tamaño de vesícula uniforme.

La extrusión de composiciones de liposomas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica conduce en una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, se hace circular la suspensión a través de la membrana una o más veces hasta que se consigue la distribución de tamaño deseada de complejo de liposoma. Los liposomas pueden extrudirse a través de membranas de poro sucesivamente más pequeño, para lograr una reducción gradual en el tamaño del liposoma. En algunos casos, las composiciones de lípido - ácido nucleico que se forman se pueden utilizar sin ningún dimensionamiento especificado.

En realizaciones particulares, los métodos de la presente invención comprenden además una etapa de neutralizar al menos algunas de las cargas de la superficie en las porciones de lípidos de las composiciones de lípido - ácido nucleico. Neutralizando al menos parcialmente las cargas de la superficie, se libera el ácido nucleico no encapsulado de la superficie de la partícula lipídica y se puede eliminar de la composición utilizando técnicas convencionales. Preferiblemente, se remueven los ácidos nucleicos adsorbidos en la superficie y no encapsulados de las composiciones resultantes a través del intercambio de soluciones amortiguadoras. Por ejemplo, la sustitución de un amortiguador de citrato (pH de aproximadamente 4,0, utilizado para la formación de las composiciones) con una solución salina amortiguada con HEPES (pH del HBS de aproximadamente 7,5), lo que resulta en la neutralización de la superficie de los liposomas y la liberación de ácido nucleico desde la superficie. El ácido nucleico liberado puede entonces ser retirado a través de cromatografía usando métodos estándar, y después se cambia a un amortiguador con un pH por encima del  $pK_a$  del lípido utilizado.

Opcionalmente, las vesículas de lípido (es decir, las partículas lipídicas) se pueden formar mediante la hidratación en un amortiguador acuoso y clasifican por tamaños utilizando cualquiera de los métodos descritos anteriormente antes de la adición del ácido nucleico, de acuerdo con el método de la vesícula preformada (PFV). Como se describió anteriormente, el amortiguador acuoso debe ser de un pH por debajo del  $pK_a$  del aminolípido. A continuación se puede añadir una solución de los ácidos nucleicos a estas vesículas preformadas clasificadas por tamaño. Para permitir la encapsulación de ácidos nucleicos en tales vesículas "preformadas", la mezcla debe contener un alcohol, tal como etanol. En el caso del etanol, debe estar presente en una concentración de aproximadamente 20% (p / p) hasta aproximadamente 45% (p / p). Además, puede ser necesario calentar la mezcla de vesículas preformadas y ácido nucleico en la mezcla acuosa de amortiguador-etanol a una temperatura de alrededor de 25 °C hasta alrededor de 50 °C dependiendo de la composición de las vesículas de lípidos y la naturaleza del ácido nucleico. Será evidente para alguien normalmente capacitado en la técnica que la optimización del proceso de encapsulación para lograr un nivel deseado de ácido nucleico en las vesículas lipídicas requerirá de la manipulación de variables tales como la concentración de etanol y temperatura. Los ejemplos de condiciones adecuadas para la encapsulación de ácido nucleico se proporcionan en los Ejemplos. Una vez que los ácidos nucleicos se encapsulan dentro de las vesículas preformadas, el pH externo se puede aumentar para neutralizar al menos parcialmente la carga superficial. A continuación se pueden remover los ácidos nucleicos adsorbidos en la superficie y no encapsulados, como se describió anteriormente.

En otras formas de realización, las partículas lipídicas de ácidos nucleicos se preparan a través de un método de mezcla continua, por ejemplo, un proceso que incluye proporcionar una solución acuosa que contiene un ácido nucleico tal como un ARNpi, en un primer depósito, y proporcionar una solución lipídica orgánica en un segundo depósito, y mezclar la solución acuosa con la solución lipídica orgánica de tal manera que la solución orgánica se mezcle con la solución acuosa a fin de producir sustancialmente en forma instantánea un liposoma que encapsula el ácido nucleico. Este proceso y el aparato para llevar a cabo este proceso se describen en detalle en la publicación de la solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2004/0142025.

En otra forma de realización, se producen las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico a través de un proceso de dilución directa que incluye la formación de una solución de liposomas e inmediatamente y directamente la introducción de la solución de liposomas a un recipiente recolector que contiene una cantidad controlada de amortiguador de dilución. En ciertas realizaciones, el recipiente de recolección incluye uno o más elementos configurados para agitar el contenido del recipiente de recolección para facilitar la dilución. En otra forma de realización, un tercer depósito que contiene amortiguador de dilución está acoplado de manera fluida a una segunda zona de mezclado. En esta forma de realización, una solución de liposoma formada en la primera zona de mezclado es inmediata y directamente mezclada con el amortiguador de dilución en la segunda región de mezcla. Los procesos y aparatos para llevar a cabo estos métodos de dilución directa se describen con más detalle en la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. 2007/0042031.

#### E. Método de uso

Las partículas lipídicas de la presente invención pueden ser utilizadas para suministrar un agente terapéutico a una célula, *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones particulares, el agente terapéutico es un ácido nucleico, que se suministra a una célula usando partículas lipídicas de la presente invención que contienen ácido nucleico. Si bien la siguiente descripción de varios métodos de uso de las partículas lipídicas y composiciones farmacéuticas relacionadas de la presente invención sirven de ejemplo mediante la descripción relacionada con las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico, se entiende que estos métodos y composiciones se pueden adaptar fácilmente para el suministro de cualquier agente terapéutico para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que se beneficiaría con dicho tratamiento.

En ciertas realizaciones, la presente invención se relaciona con métodos para la introducción de un ácido nucleico en una célula. Los ácidos nucleicos preferidos para introducción en células son ARNpi, oligonucleótidos estimulantes del sistema inmune, plásmidos, oligonucleótidos antisentido, y ribozimas. Estos métodos se pueden llevar a cabo poniendo en contacto las partículas o composiciones de la presente invención con las células durante un período de tiempo suficiente para que se produzca el suministro intracelular.

Las composiciones de la presente invención pueden ser adsorbidas por casi cualquier tipo de célula. Una vez adsorbidas, las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico pueden ser ya sea sometidas a endocitosis por una porción de las células, intercambio de lípidos con las membranas celulares, o fusión con las células. La transferencia o incorporación de la porción de ácido nucleico del complejo pueden tener lugar a través de cualquiera de estas vías. Sin pretender estar limitado con respecto al alcance de la invención, se cree que en el caso de partículas captadas en la célula por endocitosis, a continuación las partículas interactúan con la membrana endosomal, dando como resultado la desestabilización de la membrana endosomal, posiblemente por la formación de fases no bicapa, lo que resulta en la introducción del ácido nucleico encapsulado en el citoplasma celular. Del mismo modo en el caso de la fusión directa de las partículas con la membrana plasmática de la célula, cuando tiene lugar la fusión, la membrana del liposoma se integra en la membrana celular y el contenido del liposoma se combina con el fluido intracelular. El contacto entre las células y las composiciones de lípido - ácido nucleico, cuando se lleva a cabo *in vitro*, se llevará a cabo en un medio biológicamente compatible. La concentración de las composiciones puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero está generalmente entre aproximadamente 1  $\mu\text{mol}$  y aproximadamente 10 mmoleses. En ciertas realizaciones, el tratamiento de las células con las composiciones de lípido - ácido nucleico generalmente se lleva a cabo a temperaturas fisiológicas (alrededor de 37 °C) durante períodos de tiempo de aproximadamente 1 a 24 horas, preferiblemente de aproximadamente 2 a 8 horas. Para aplicaciones *in vitro*, el suministro de ácidos nucleicos puede ser a cualquier célula crecido en cultivo, ya sean de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tipo o tejido. En realizaciones preferidas, las células serán células animales, más preferiblemente células de mamífero, y lo más preferiblemente células humanas.

En un grupo de realizaciones, se añade una suspensión de partículas lipídicas que contienen ácido nucleico a células sembradas en placa con una confluencia del 60 - 80% que tienen una densidad celular de aproximadamente  $10^3$  hasta aproximadamente  $10^5$  células / mL, más preferiblemente de aproximadamente  $2 \times 10^4$  células / mL. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 20  $\mu\text{g}$  / mL, más preferiblemente de aproximadamente 1  $\mu\text{g}$  / mL.

Las aplicaciones típicas incluyen el uso de procedimientos bien conocidos para proporcionar el suministro intracelular de ARNpi para destruir o silenciar objetivos celulares específicos. Alternativamente, las aplicaciones

5 incluyen el suministro de secuencias de ADN o ARNm que codifican para polipéptidos terapéuticamente útiles. De esta manera, se proporciona una terapia para enfermedades genéticas mediante el suministro de productos génicos deficientes o ausentes (es decir, para la distrofia de Duchenne, véase Kunkel, et al., Brit. Med. Bull. 45 (3): 630 - 643 (1989), y para la fibrosis quística, véase Goodfellow, Nature 341: 102 - 103 (1989)). Otros usos para las composiciones de la presente invención incluyen la introducción de oligonucleótidos antisentido en células (véase, Bennett, et al., Mol. Pharm. 41: 1023 - 1033 (1992)).

10 Alternativamente, las composiciones de la presente invención también pueden ser utilizadas para el suministro de ácidos nucleicos a las células *in vivo*, utilizando métodos que son conocidos por aquellos capacitados en la técnica. Con respecto a la aplicación de la invención para el suministro de ADN o secuencias de ARNm, Zhu, et al., Science 261: 209 - 211 (1993), describe el suministro en forma intravenosa del plásmido de expresión citomegalovirus (CMV) - cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) utilizando complejos de DOTMA-DOPE. Hyde, et al., Nature 362: 250 - 256 (1993), describe el suministro del gen regulador de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) a epitelios de las vías respiratorias y a los alvéolos en el pulmón de ratones, utilizando liposomas. Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298: 278 - 281 (1989), describe la transfección *in vivo* de pulmones de ratones con un gen procarionota en funcionamiento que codifica la enzima intracelular, cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Por lo tanto, las composiciones de la invención se pueden usar en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

20 Para administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente por vía parenteral, es decir, en forma intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, por vía subcutánea, o intramuscular. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo. Para un ejemplo, véase Stadler, et al., patente de los Estados Unidos No. 5.286.634. El suministro de ácido nucleico intracelular también ha sido discutido en Straubinger, et al., Methods in Enzymology, Academic Press, Nueva York. 101: 512 - 527 (1983); Mannino, et al., Biotechniques 6: 682 - 690 (1988); Nicolau, et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst. 6: 239 - 271 (1989), y Behr, Acc. Chem. Res. 26: 274 - 278 (1993). Sin embargo, otros métodos de administración de agentes terapéuticos a base de lípidos se describen, por ejemplo, en Rahman et al., patente de los Estados Unidos No. 3.993.754; Sears, patente de los Estados Unidos No. 4.145.410; Papahadjopoulos et al., patente de los Estados Unidos No. 4.235.871; Schneider, patente de los Estados Unidos No. 4.224.179; Lenk et al., patente de los Estados Unidos No. 4.522.803; y Fountain et al., patente de los Estados Unidos No. 4.588.578.

30 En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas pueden ponerse en contacto con el tejido objetivo mediante aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación puede ser hecha por medio de procedimientos tópicos, "abiertos" o "cerrados". Por "tópica", se entiende la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al entorno, tal como la piel, orofaringe, canal auditivo externo, y similares. Procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen la incisión de la piel de un paciente y la visualización directa del tejido subyacente a los que se aplican los preparados farmacéuticos. Esto se logra generalmente mediante un procedimiento quirúrgico, tal como una toracotomía para acceder a los pulmones, laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales, u otro abordaje quirúrgico directo al tejido objetivo. Procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos objetivo internos no se visualizan directamente, pero se accede a través de la inserción de instrumentos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden administrarse al peritoneo por medio de lavado de aguja. Del mismo modo, las preparaciones farmacéuticas se pueden administrar a las meninges o la médula espinal mediante infusión durante un pinchazo lumbar, seguido del posicionamiento adecuado del paciente como se practica comúnmente para la anestesia espinal o de formación de imágenes con metrazamida de la médula espinal. Alternativamente, las preparaciones pueden ser administradas a través de dispositivos endoscópicos.

45 Las composiciones de lípido - ácido nucleico también se pueden administrar mediante un aerosol inhalado en los pulmones (véase, Brigham et al., Am. J. Sci. 298 (4): 278 - 281 (1989)) o por inyección directa en el sitio de la enfermedad (Culver, Human Gene Therapy, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York. páginas 70 - 71 (1994)).

Los métodos de la presente invención se puede practicar en una variedad de huéspedes. Los huéspedes preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ganado, caballos, ovejas, y similares.

50 Las dosis para las partículas lipídicas con agente terapéutico de la presente invención dependerán de la relación de agente terapéutico con respecto al lípido y la opinión del médico para la administración basada en la edad, peso y estado del paciente.

55 En una forma de realización, la presente invención se relaciona con un método para modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo. Estos métodos generalmente comprenden poner en contacto una célula con una partícula lipídica de la presente invención que se asocia con un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo. Como se usa aquí, el término "modulación" se refiere a la alteración de la expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo. En diferentes realizaciones, la modulación puede significar aumentar o mejorar, o puede significar disminuir o reducir. Los métodos para medir el nivel de expresión de un

polinucleótido o polipéptido objetivo son conocidos y se encuentran disponibles en el arte e incluyen, por ejemplo, métodos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) y técnicas de inmunohistoquímica. En realizaciones particulares, el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido objetivo se incrementa o reduce en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, o mayor al 50% en comparación con un valor de control apropiado.

Por ejemplo, si se incrementa la expresión de un polipéptido deseado, el ácido nucleico puede ser un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. Por otro lado, si se desea la reducción de la expresión de un polinucleótido o polipéptido, entonces el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, ARNpi, microARN o que comprende una secuencia de polinucleótido que se hibrida específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido objetivo, alterando de esta manera la expresión del polinucleótido o polipéptido objetivo. Alternativamente, el ácido nucleico puede ser un plásmido que expresa tal oligonucleótido antisentido, ARNpi, o microARN.

En una forma de realización particular, la presente invención se refiere a un método para modular la expresión de un polipéptido por una célula, que comprende proporcionar a una célula una partícula lipídica que consiste de o consiste esencialmente de DLin-K-C2-DMA, DSPC, Chol y PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, por ejemplo, en una relación molar de alrededor de 20 - 60% de DLin-K-C2-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica se asocia con un ácido nucleico capaz de modular la expresión del polipéptido. En realizaciones particulares, la relación molar de lípidos es de aproximadamente 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye con POPC, DOPE o SM. En otras formas de realización, el lípido catiónico se sustituye con DLin-K<sup>2</sup>-DMA o DLin-K6-DMA.

En realizaciones particulares, el agente terapéutico se selecciona de un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNpi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en el que el ARNpi, microARN, o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo, de tal manera que la expresión del polipéptido se reduce.

En otras formas de realización, el ácido nucleico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de tal manera que la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento del mismo se incrementa.

En realizaciones relacionadas, la presente invención se refiere un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica de la presente invención, en donde el agente terapéutico se selecciona de un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNpi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNpi, microARN, o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste de, o consiste esencialmente de DLin-K-C2-DMA, DSPC, Chol y PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, por ejemplo, en un relación molar de aproximadamente 20 - 60% de DLin-K-C2-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica se asocia con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación molar de lípido es de aproximadamente 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye con POPC, DOPE o SM. En otras formas de realización, el lípido catiónico se sustituye con DLin-K<sup>2</sup>-DMA o DLin-K6-DMA.

En otra realización relacionada, la presente invención incluye un método para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión reducida de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica de la presente invención, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.

En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste de, o consiste esencialmente de DLin-K-C2-DMA, DSPC, Chol y PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, por ejemplo, en un relación molar de aproximadamente 20 - 60% de DLin-K-C2-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica se asocia con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación molar de lípidos es de aproximadamente 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye con POPC, DOPE o SM. En otras formas de realización, el lípido catiónico se sustituye con DLin-K<sup>2</sup>-DMA o DLin-K6-DMA.

La presente invención se refiere además a un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto la composición farmacéutica de la presente invención, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico. En ciertas formas de realización, la respuesta inmune es una respuesta humoral o una respuesta inmune de la mucosa. En una forma de realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste de, o consiste esencialmente de DLin-K-C2-DMA, DSPC, Chol y PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, por ejemplo, en un relación molar de aproximadamente 20 - 60% de DLin-K-C2-DMA : 5 - 25% de DSPC : 25 - 55% de Chol : 0,5 - 15% de PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA, en donde la partícula lipídica se asocia con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la relación molar de lípidos es de aproximadamente 40 / 10 / 40 / 10 (% en moles de DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-DMA). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones se sustituye con POPC, DOPE o SM. En otras formas de realización, el lípido catiónico se sustituye con DLin-K<sup>2</sup>-DMA o DLin-K6-DMA.

En otras formas de realización, se proporciona la composición farmacéutica al sujeto en combinación con una vacuna o antígeno. Por lo tanto, la presente invención por sí misma proporciona vacunas que comprenden una partícula lipídica de la presente invención, que comprende un oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico, y también se asocia con un antígeno para el que se desea una respuesta inmune. En realizaciones particulares, el antígeno es un antígeno tumoral o está asociado con un agente infeccioso, tal como, por ejemplo, un virus, bacteria, o parásito.

Una variedad de antígenos tumorales, antígenos de agentes infecciosos, y antígenos asociados con otra enfermedad son bien conocidos en la técnica y ejemplos de estos se describen en las referencias citadas en el presente documento. Ejemplos de antígenos adecuados para uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, antígenos de polipéptidos y antígenos de ADN. Ejemplos específicos de antígenos son antígenos de la hepatitis A, la hepatitis B, la viruela, la poliomielitis, ántrax, la gripe, el tifus, el tétanos, el sarampión, rotavirus, la difteria, la tos ferina, la tuberculosis y la rubéola. En una realización preferida, el antígeno es un antígeno recombinante de la hepatitis B. En otros aspectos, el antígeno es un antígeno recombinante de la hepatitis A. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno tumoral. Ejemplos de tales antígenos asociados a tumores son antígeno de MUC-1, VEB y antígenos asociados con el linfoma de Burkitt. En un aspecto adicional, el antígeno es un antígeno recombinante de antígeno tumoral de proteína relacionada con la tirosinasa. Aquellos capacitados en la técnica sabrán de otros antígenos adecuados para uso en la presente invención.

Antígenos asociados a tumores adecuados para uso en la presente invención incluyen tanto moléculas mutadas como no mutadas que pueden ser indicativas de un solo tipo de tumor, compartidas entre varios tipos de tumores, y / o expresadas o sobreexpresadas exclusivamente en células tumorales en comparación con las células normales. Además de las proteínas y glicoproteínas, los patrones específicos de tumores de expresión de carbohidratos, gangliósidos, glicolípidos y mucinas también se han documentado. Ejemplos de antígenos asociados a tumores para uso en las vacunas contra el cáncer en sujetos incluyen productos proteicos de oncogenes, genes supresores de tumores y otros genes con mutaciones o reordenamientos únicos para células tumorales, productos génicos embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos del tejido (pero no específicos del tumor), receptores del factor de crecimiento, residuos de carbohidratos de la superficie celular, proteínas virales extrañas y una cantidad de otras proteínas propias.

Las realizaciones específicas de antígenos asociados a tumores incluyen, por ejemplo, antígenos mutados tales como los productos proteicos de los protooncogenes Ras p21, el supresor de tumores p53 y los oncogenes BCR-abl, así como CDK4, MUM1, la caspasa 8, y la catenina Beta; antígenos sobreexpresados tales como la galectina 4, la galectina 9, anhidrasa carbónica, Aldolasa A, PRAME, Her2/neu, ErbB-2 y KSA, antígenos oncofetales tales como fetoproteína alfa (AFP), gonadotropina coriónica humana (hCG); antígenos propios, tales como el antígeno carcinoembrionario (CEA) y antígenos de diferenciación de melanocitos tales como Mart 1/Melan A, gp100, gp75, Tirosinasa, TRP1 y TRP2; antígenos asociados con la próstata tales como PSA, PAP, PSMA, PSM-P1 y PSM-P2; productos génicos embrionarios reactivados tales como MAGE 1, MAGE 3, MAGE 4, GAGE 1, GAGE 2, BAGE, RAGE, y otros antígenos testiculares cancerosos tales como NY-ESO1, SSX2 y SCP1; mucinas tales como Muc-1 y Muc-2; gangliósidos tales como GM2, GD2 y GD3, glicolípidos neutros y glicoproteínas tales como Lewis (y) y globo-H; y glicoproteínas tales como Tn, antígeno de Thompson-Freidenreich (TF) y sTn. También se incluyen como antígenos asociados a tumores en la presente memoria lisados de células enteras y de células tumorales, así como porciones inmunogénicas de los mismos, así como idiotipos de inmunoglobulina expresados en proliferaciones monoclonales de linfocitos B para uso contra linfomas de células B.

Los patógenos incluyen, pero no se limitan a, agentes infecciosos, por ejemplo, virus, que infectan a mamíferos, y más particularmente a seres humanos. Ejemplos de virus infecciosos incluyen, pero no se limitan a: Retroviridae (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, como el VIH-1 (también conocidos como HTLV-III, LAV o HTLV-III / LAV, o VIH-III, y otro aislados, como el VIH-LP; Picornaviridae (por ejemplo, los virus de la poliomielitis, la hepatitis A; enterovirus, virus Coxsackie humanos, rinovirus, ecovirus); Calciviridae (por ejemplo, las cepas que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus);

Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del Ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus de parainfluenza, virus de las paperas, virus del sarampión, virus respiratorio sincitial); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la influenza); Bungaviridae (por ejemplo, hantavirus, virus bunga, flebovirus y virus Nairo); Arenaviridae (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus poliovirus); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Poxviridae (virus de la viruela, virus vacuna, virus de la viruela), y Iridoviridae (por ejemplo, virus de la fiebre porcina africana), y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de encefalopatías espongiiformes, el agente de la hepatitis delta (se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de hepatitis no A, de la hepatitis no B (clase 1 = transmitida internamente; clase 2 = transmitida parenteralmente (es decir, hepatitis C); Norwalk y virus relacionados, y astrovirus).

También, bacterias gram negativas y gram positivas sirven como antígenos en animales vertebrados. Tales bacterias gram positivas incluyen, pero no se limitan a especies de *Pasteurella*, especies de estafilococos, y especies de estreptococos. Las bacterias gram negativas incluyen, pero no se limitan a, *Escherichia coli*, especies de *Pseudomonas*, y especies de *Salmonella*. Los ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, pero no se limitan a: *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium* spp (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus* (grupo viridans), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (especies anaeróbicas), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp., *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

Ejemplos adicionales de agentes patógenos incluyen, pero no se limitan a, hongos infecciosos que infectan a mamíferos, y más particularmente en seres humanos. Ejemplos de hongos infecciosos incluyen, pero no se limitan a: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Ejemplos de parásitos infecciosos incluyen *Plasmodium* tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*. Otros organismos infecciosos (es decir, protistas) incluyen *Toxoplasma gondii*.

## Ejemplos

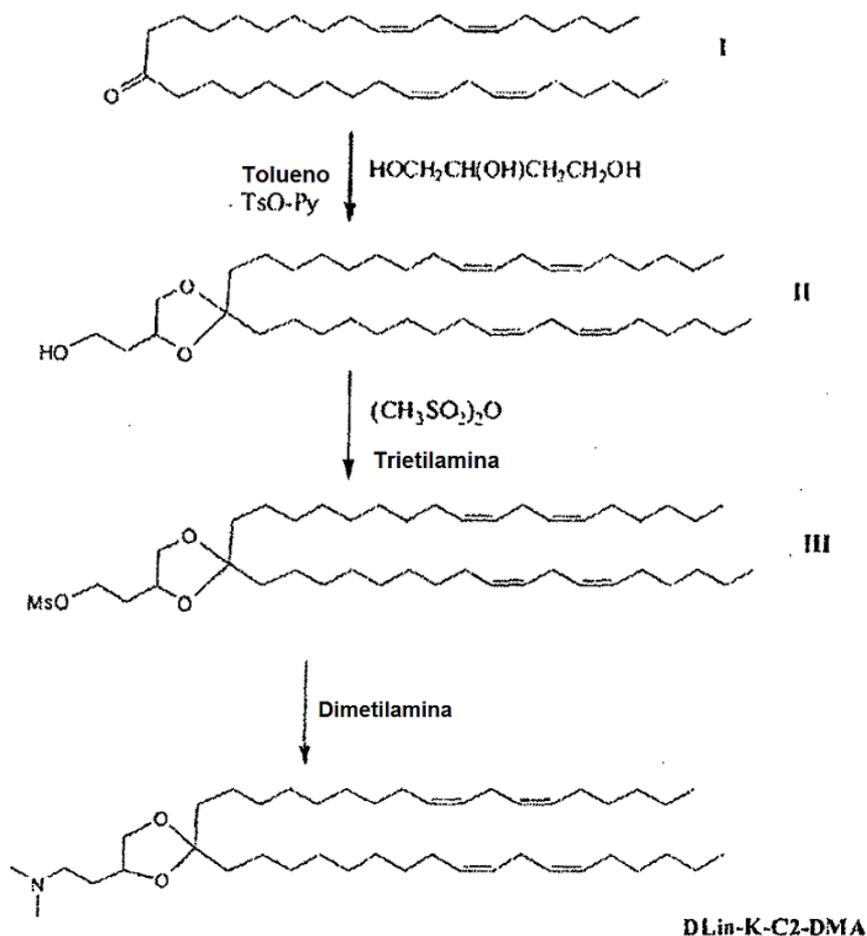
### Ejemplo 3

Síntesis de 2,2-dilinoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA)

DLin-K-C2-DMA se sintetizó como se muestra en el diagrama esquemático y la descripción a continuación.

Síntesis de 2,2-dilinoil-4-(2-hidroxietil)-[1,3]-dioxolano (II)

Una mezcla de la dilinoil cetona (I, previamente preparada como se describe en el Ejemplo 1, 527 mg, 1,0 mmol), 1,3,4-butanotriol (grado técnico, aprox. 90%, 236 mg, 2 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (50 mg, 0,2 mmoles) en 50 mL de tolueno se calentó a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. La evaporación del disolvente dio lugar a un residuo oleoso de color amarillento (0,6 g). El producto sin purificar se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 100 mL) con diclorometano como eluyente. Esto produjo 0,5 g de II puro como un aceite incoloro. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5,25 - 5,48 (8H, m, 4 x CH=CH), 4,18 - 4,22 (1H, m, OCH), 4,08 (1H, dd, OCH), 3,82 (2H, t,  $\text{OCH}_2$ ), 3,53 (1H, t, OCH), 2,78 (4H, t, 2 x C=C-CH<sub>2</sub>-C=C), 2,06 (8H, q, 4 x CH<sub>2</sub> alílico), 1,77 - 1,93 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1,52 - 1,68 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>), 1,22 - 1,45 (32H, m), 0,86 - 0,94 (6H, t, 2 x CH<sub>3</sub>) ppm.



#### Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(2-metanosulfonietil)-[1,3]-dioxolano (III)

- 5 A una solución de 2,2-dilinoleil-4-(2-hidroxi-etil)-[1,3]-dioxolano (II, 500 mg, 0,81 mmoles) y trietilamina seca (218 mg, 2,8 mmoles) en 50 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro se le añadió anhídrido de metanosulfonilo (290 mg, 1,6 mmoles) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se diluyó con 25 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La fase orgánica se lavó con agua (2 x 30 mL), salmuera (50 mL), y se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro. El disolvente se evaporó para producir 510 mg de un aceite amarillento. El producto sin purificar se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

- 10 Síntesis de 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA)

- 15 Al material anterior sin purificar (III) en atmósfera de nitrógeno se le añadieron 20 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 6 días. Se obtuvo un residuo aceitoso después de la evaporación del disolvente. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230- 400, 100 mL) con un gradiente de metanol de 0 - 5% en diclorometano como eluyente produjo 380 mg del producto DLin-K-C2-DMA como un aceite pálido. RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 5,27 - 5,49 (8, m, 4x  $\text{CH}=\text{CH}$ ), 4,1 - 4,15 (2H, m, 2 x OCH), 3,49 (1 H, t OCH), 2,78 (4H, t, 2 x  $\text{C}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{C}$ ), 2,34 - 2,54 (2H, m,  $\text{NCH}_2$ ), 2,30 (6H, s, 2 x  $\text{NCH}_3$ ), 2,06 (8H, q, 4 x  $\text{CH}_2$  alílico), 1,67 - 1,95 (2H, m,  $\text{CH}_2$ ), 1,54 - 1,65 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2$ ), 1,22 - 1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x  $\text{CH}_3$ ) ppm.

#### Ejemplo 6

##### Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA)

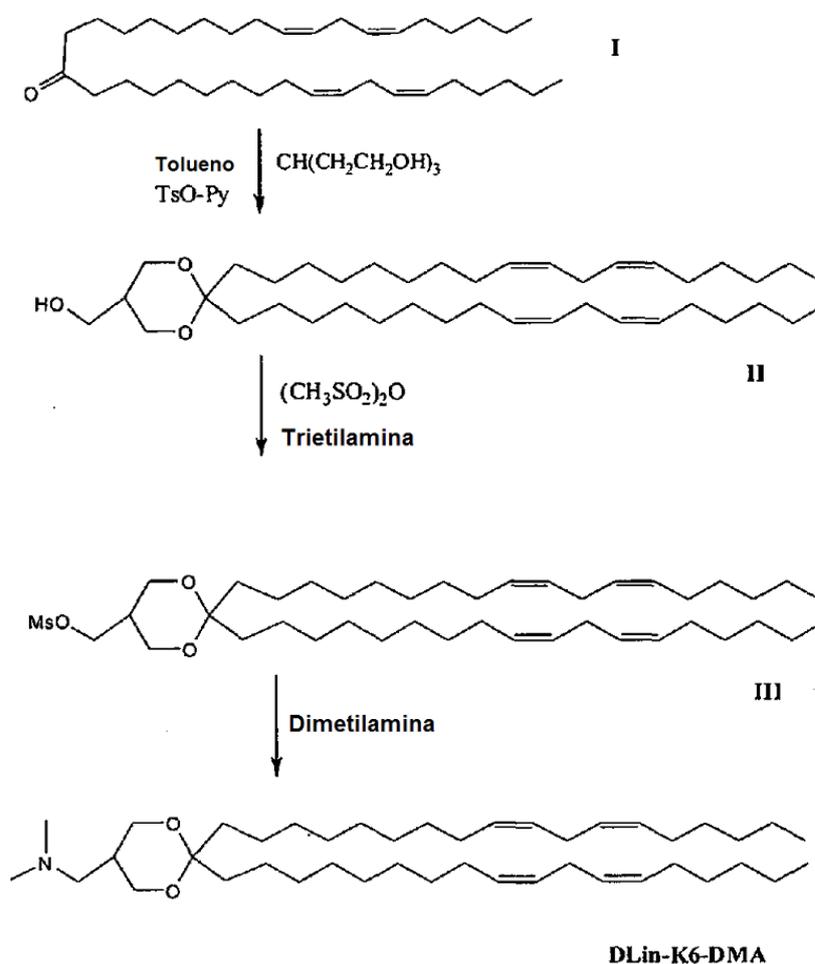
- 20 DLin-K6-DMA se sintetizó como se describe y se muestra en el diagrama esquemático siguiente.

##### Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-hidroximetil-[1,3]-dioxano (II)

Una mezcla de dilinoleil cetona (I, previamente preparada como se describe en el Ejemplo 1, 1,05 g, 2,0 mmoles), 2-hidroximetil-1,3-propanodiol (475 mg, 4 mmoles) y p-toluenosulfonato de piridinio (100 mg, 0,4 mmoles) en 150 mL de tolueno se calentó a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante la noche con un tubo Dean-Stark para eliminar el

agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 60 mL), salmuera (60 mL), y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La evaporación del disolvente dio lugar a un aceite pálido (1,2 g). El producto sin purificar se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 100 mL) con gradiente de 0 - 1% de metanol en diclorometano como eluyente. Esto produjo 1,0 g de II puro como un aceite incoloro.

5



Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-metanosulfonilmetil-[1,3]-dioxano (III)

- 10 A una solución de 2,2-dilinoleil-5-hidroxiometil-[1,3]-dioxano (II, 1,0 g, 1,6 mmoles) y trietilamina seca (430 mg, 4,2 mmoles) en 120 mL de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro se le añadió anhídrido de metanosulfonilo (600 mg, 3,3 mmoles) en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La fase orgánica se lavó con agua (2 x 60 mL), salmuera (60 mL), y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. El disolvente se evaporó para producir 1,1 g de aceite de color pálido. El producto sin purificar se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.
- 15

Síntesis de 2,2-dilinoleil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA)

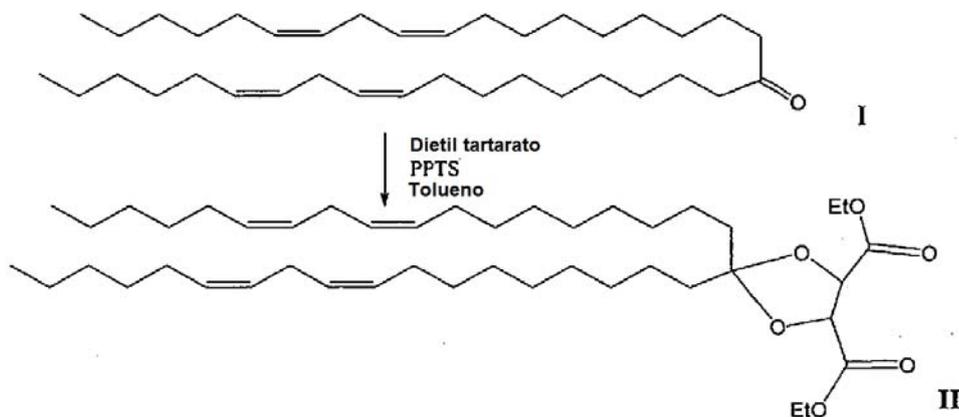
- Al material anterior sin purificar (III, 1,1 g) bajo atmósfera de nitrógeno se le añadieron 20 mL de dimetilamina en THF (2,0 M). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 7 días. Se obtuvo un residuo aceitoso después de la evaporación del disolvente. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 100 mL) con un gradiente de 0 - 30% de acetato de etilo en hexanos como eluyente dio lugar a 260 mg del producto DLin-K<sup>6</sup>-DMA como un aceite pálido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,24 - 5,51 (8, m, 4x CH=CH), 4,04 (2H, dd, 2 x OCH), 3,75 (2H, dd OCH), 2,7 - 2,9 (2H, br, NCH<sub>2</sub>), 2,78 (4H, t, 2 x C=C-CH<sub>2</sub>-C=C), 2,57 (6H, s, 2 x NCH<sub>3</sub>), 1,95 - 2,17 (9H, q, 4 x CH<sub>2</sub> alílico y CH), 1,67 - 1,95 (2H, m, CH<sub>2</sub>), 1,54 - 1,65 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>), 1,22 - 1,45 (32H, m), 0,90 (6H, t, 2 x CH<sub>3</sub>) ppm.
- 20

## 25 Ejemplo 13

Síntesis de 2,2-dilinoleil-4,5-bis(dimetilamino metil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K<sup>2</sup>-DMA)

DLin-K<sup>2</sup>-DMA se sintetizó como se describe y se muestra en los diagramas esquemáticos siguientes.

Síntesis de D-Lin-K-dietiltartarato (II)

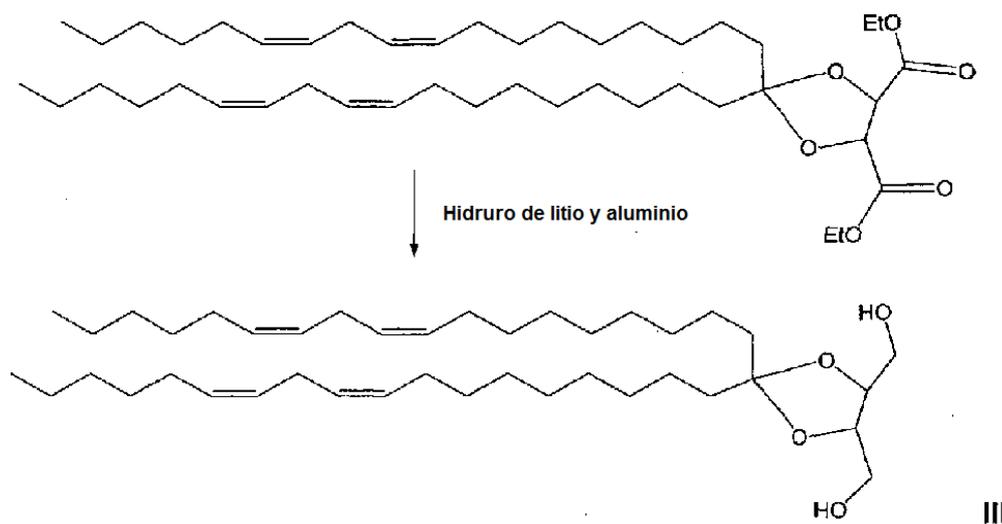


- 5 Una mezcla de D-Lin-cetona (I, 1 gramo, 1,9 mmoles), dietil-D-tartarato (412 mg, 2 mmoles) y piridinio p-tolueno sulfonato (250 mg, 1 mmoles) en 25 mL de tolueno se calentó a reflujo bajo atmósfera de nitrógeno durante dos días con un tubo Dean-Stark para eliminar el agua. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente. La fase orgánica se lavó con agua, NaHCO<sub>3</sub> y salmuera (2 X 50 mL) y se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. La evaporación del disolvente dio lugar a un residuo oleoso de color amarillento. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 500 mL) se eluyó con un gradiente de 0 - 10% de éter en hexanos como eluyente y produjo 400 mg de D-Lin-dietiltartarato (II) puro.

10 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,27 - 5,46 (8H, m), 4,67 (2H, s), 4,20 - 4,30 (1H, t), 2,75 (4H, t), 2,02 - 2,09 (8H, m), 1,62 - 1,72 (4H, m), 1,2 - 1,47 (32 H, m), 0,87 - 0,90 (6H, t) ppm.

Síntesis de D-Lin-K-dietildioli (III)

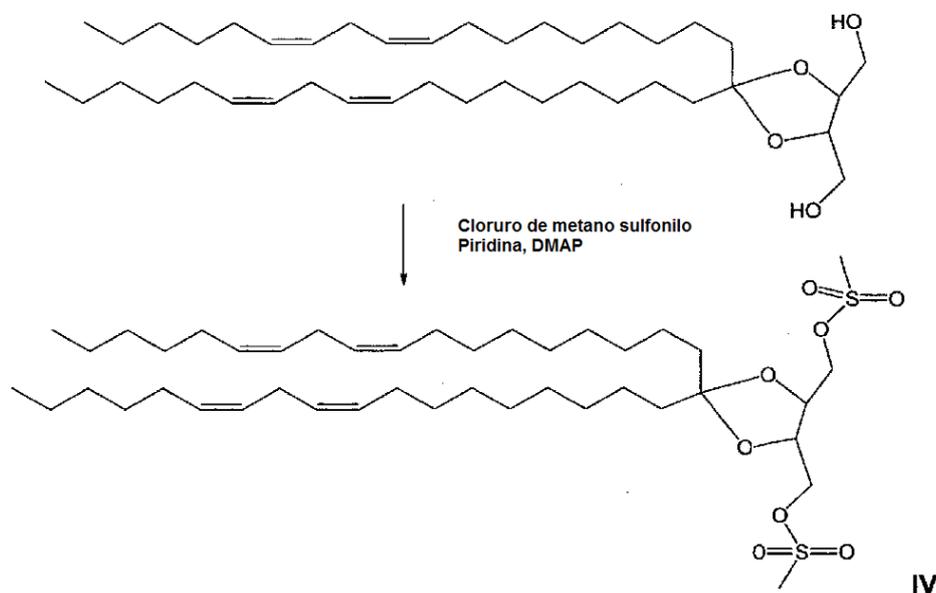
- 15 A una solución de hidruro de litio y aluminio (32 mg, 1 mmoles) en THF seco se le añadió una solución de D-Lin-K-dietiltartarato (II, 600 mg, 0,85 mmoles) en THF seco a 0 °C bajo atmósfera de argón y después se agitó la reacción durante cuatro horas a temperatura ambiente. Se detuvo la mezcla de reacción con agua enfriada con hielo y después se filtró a través de Celite y la evaporación del disolvente produjo el alcohol reducido sin purificar. La cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 500 mL) eluida con gradientes de 10 - 40% de acetato de etilo en hexanos como eluyente produjo 350 mg de D-Lin-dietiltartarato (III) puro.



- 20 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,27 - 5,46 (8H, m), 3,95 (2H, t), 3,65 - 3,85 (4H, dd), 2,75 (4H, t), 2,2 - 2,9 (8H, m), 1,62 - 1,72 (4H, m), 1,2 - 1,47 (32 H, m), 0,87 - 0,90 (6H, t) ppm.

Síntesis de D-Lin-K-dietildimesilato (IV)

A una mezcla de D-Lin-K-dietiltartarato (III), alcohol (570 mg, 0,95 mmoles) en piridina diclorometano seco (275 mg, 3,85 mmoles) y 4-(dimetilamino)piridina (122 mg, 1 mmoles) se le añadió lentamente a esta solución, bajo atmósfera de argón, una solución de cloruro de metano sulfonilo (500 mg, 2,5 mmoles) y se agitó durante la noche.

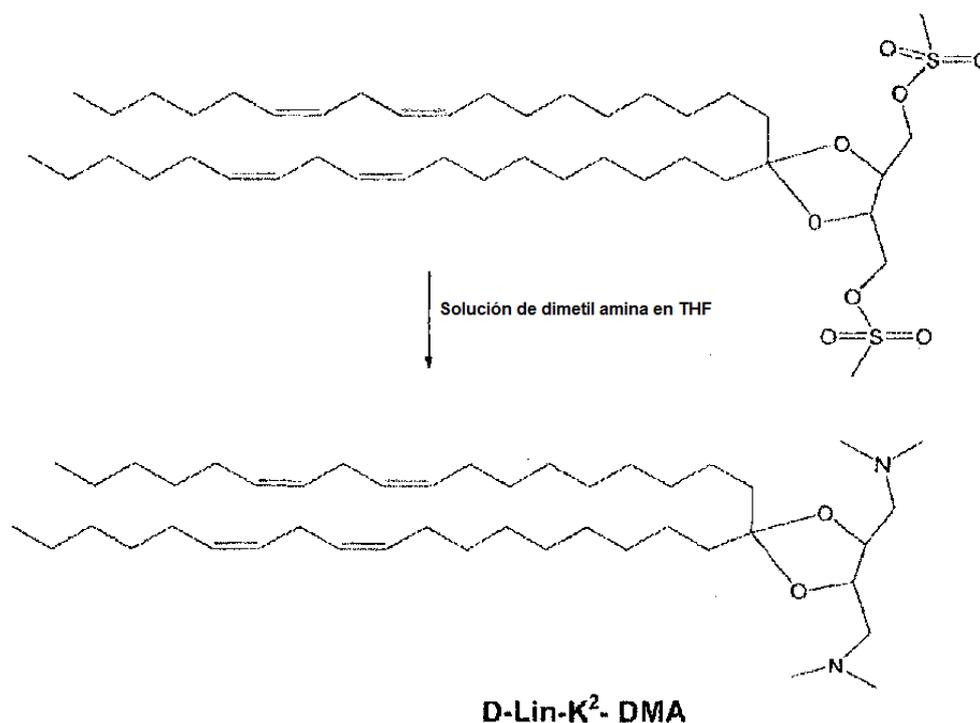


- 5 Se lavó la fase orgánica con agua y salmuera (2 X 50 mL) y después se evaporó el disolvente para producir un residuo de aceite de color amarillento. Se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 500 mL), se eluyó con gradientes de 10 - 40% de acetato de etilo en hexanos como eluyente, lo que produjo 300 mg de D-Lin-dietiltartarato (IV) puro.

10 RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,27 - 5,46 (8H, m), 4,35 (4H, d), 4,12 - 4,17 (2H, t), 3,08 (6H, s), 2,75 (4H, t), 2,2 - 2,9 (8H, m) 1,62 - 1,72 (4H, m), 1,2 - 1,47 (32 H, m), 0,87 - 0,90 (6H, t) ppm.

#### Síntesis de D-Lin-K<sup>2</sup>-DMA

- 15 Se añadió una solución de dimetil amina anhidra en THF al recipiente de reacción que contenía (300 mg) de D-Lin-dietiltartarato (IV) a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, se selló el matraz de reacción y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 6 días. La evaporación del disolvente produjo 300 mg de residuo. El producto sin purificar se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice (malla 230 - 400, 500 mL) eluyendo con gradientes de 0 - 10% de metanol en cloroformo como eluyente lo que produjo 50 mg de D-Lin-K<sup>2</sup>-DMA pura.



RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ: 5,27 - 5,46 (8H, m), 3,72 - 3,80 (2H, t), 2,75 (4H, t), 2,49 (4H, d), 2,30 (12H, s), 2,2 - 2,9 (8H, m), 1,62 - 1,72 (4H, m), 1,2 - 1,47 (32 H, m), 0,87 - 0,90 (6H, t) ppm.

### Ejemplo 16

#### 5 Influencia de lípido catiónico en el silenciamiento génico *in vivo*

Está bien establecido que el silenciamiento de ARNi *in vivo* de proteínas específicas de hepatocito se puede lograr después de administración intravenosa (i.v.) de ARNpi encapsulado en, o asociado con, nanopartículas seleccionadas diseñadas para suministro intracelular. Uno de los más activos, y mejor caracterizado de estos es una partícula lipídica estable con ácido nucleico (SNALP) que contiene el lípido catiónico 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA). En este ejemplo, se aplicó el diseño racional en combinación con selección *in vivo* para modificar sistemáticamente la estructura de DLinDMA e identificar características moleculares que aumentan o reducen la potencia lipídica catiónica. Se sintetizaron más de 30 lípidos y se incorporaron en partículas lipídicas que contenían ácido nucleico, es decir, nanopartículas lipídicas (LN) que encapsulan un ARNpi (LN-ARNpi) dirigido al Factor VII (FVII), un componente de coagulación de la sangre sintetizado y secretado por los hepatocitos que se mide fácilmente en el suero. Se prepararon sistemas de LN-ARNpi utilizando el mismo proceso, relaciones molares de lípidos y tamaño de partícula para minimizar los efectos sobre la actividad resultantes de las características de la formulación diferentes del lípido catiónico. Se administró cada formulación como una sola inyección en bolo en un intervalo de dosis que permiten una estimación de la dosis de ARNpi requerida para reducir las concentraciones de proteína en suero del FVII en un 50% después de 24 h (ED<sub>50</sub>).

20 Los estudios descritos en el presente documento se realizaron utilizando los siguientes materiales y métodos.

#### Materiales y métodos

##### Lípidos

Los lípidos catiónicos se sintetizaron como se describió en los Ejemplos anteriores. Se adquirió diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) a través de Northern Lipids (Vancouver, Canadá). El colesterol se adquirió a través de Sigma Chemical Company (St. Louis, Missouri, EE.UU.) o Solvay Pharmaceuticals (Weesp, Países Bajos).

La síntesis de N-[(metoxi poli(etilén glicol)<sub>2000</sub>carbamilo]-1,2-dimiristiloxipropil-3-amina (PEG-C-DMA) y N-[(metoxi poli (etilén glicol)<sub>2000</sub>succinimidil]-1,2-dimiristiloxipropil-3-amina (PEG-S-DMA) se efectuó como lo describen Hayes et al., J. Control Release 112: 280 - 290 (2006). Se sintetizó R-3-[(ω-metoxi-poli(etilén glicol)<sub>2000</sub>carbamoil]-1,2-dimiristiloxipropil-3-amina (PEG-C-DOMG) como se describe en el presente documento y por Akinc et al., Nat. Biotechnol. 26: 561 - 56 (2008). Estos tres PEG-lípidos eran intercambiables en la formulación sin actividad

impactante (datos no mostrados). Por lo tanto, en todo el texto, se hace referencia generalmente a PEG-lípido para fines de claridad.

#### Síntesis de ARNpi

5 Todos los ARNpi y oligorribonucleótidos 2'-OMe fueron sintetizados por Alnylam como se describe en John et al. (avance de la publicación en línea de Nature en línea, 26 de septiembre de 2007 (DOI: 10.1038/nature06179)). Los oligonucleótidos se caracterizaron por espectrometría de masas mediante electroaspersión y HPLC de intercambio aniónico.

Las secuencias de los ARNpi utilizadas en estos estudios fueron las siguientes:

si-FVII sentido, 5'- GGAUCAUCUCAAGUCUUACTT -3' (SEQ ID NO: 33);

10 si-FVII antisentido, 5'- GUAAGACUUGAGAUGAUCCTT -3' (SEQ ID NO: 34);

si-Luc sentido, 5' -cuuAcGcuGAGuAcuucGATT -3' (SEQ ID NO: 35);

si-Luc antisentido, 5'- UCGAAGuACUcAGCGuAAGTT -3' (SEQ ID NO: 36),

15 con letras minúsculas denotan nucleótidos modificados con 2'-O-Me, y las letras subrayadas denotan nucleótidos modificados con 2'-F. Todos los ARNpi contenían enlaces de fosforotioato entre las dos timidinas (T) en el extremo 3' de cada cadena.

#### Método de vesículas preformadas para formular partículas lipídicas con ácido nucleico

20 Se elaboraron partículas lipídicas con ácido nucleico utilizando el método de la vesícula preformada (PFV), esencialmente como se describe en Maurer et al. (Biophys J., 2001). Se solubilizaron lípido catiónico, DSPC, colesterol y PEG-lípido en etanol con una relación molar de 40 / 10 / 40 / 10, respectivamente. La mezcla de lípidos se añadió a un amortiguador acuoso (citrate 50 mM, pH 4) con mezcla hasta una concentración final de etanol y de lípidos del 30% (vol / vol) y 6,1 mg / mL respectivamente y se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 2 min antes de extrusión. Los lípidos hidratados fueron extrudidos a través de dos filtros apilados con tamaño de poro de 80 nm (Nuclepore) a 22 °C utilizando una extrusora Lipex (Hope, M. J. et al. Biochim. Biophys. Acta 812: 55 - 65 (1985)) hasta que se obtuvo un diámetro de vesícula de 70 - 90 nm, como se determinó mediante el análisis de Nicomp. Esto requiere generalmente de 1 - 3 pasadas. Se añadió el ARNpi de FVII (solubilizado en un citrate 50 mM, solución acuosa de pH 4 que contenía 30% de etanol) a las vesículas previamente equilibradas (35 °C), a una velocidad de ~ 5mL / min con mezcla. Después de una relación final objetivo de ARNpi / lípido de 0,06 (p / p), la mezcla se incubó durante 30 min a 35 °C para permitir la reorganización de la vesícula y la encapsulación del ARNpi de FVII. A continuación, se removió el etanol y se reemplazó el amortiguador externo con PBS (NaCl 155 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, pH 7,5) ya sea por diálisis o diafiltración de flujo tangencial.

#### Análisis del tamaño de partícula

35 La distribución por tamaño de las formulaciones de ARNpi liposomal se determinó usando un medidor de partículas de tamaño inferior a micras NICOMP Modelo 380 (PSS NICOMP, Particle Sizing Systems, Santa Bárbara, CA). Los diámetros promedio de partícula estaban por lo general en el rango de 50 - 120 nm, dependiendo de la composición de lípidos utilizados. Las formulaciones de ARNpi liposomal eran generalmente homogéneas y tenían desviaciones estándar (del tamaño promedio de partícula) de 20 - 50 nm, dependiendo de la composición de los lípidos y de las condiciones de la formulación utilizada.

#### Medición de ARNpi libre por cromatografía de intercambio iónico

40 Se usó cromatografía de intercambio aniónico utilizando ya sea columnas de Sefarosa DEAE o dispositivos centrífugos comerciales (columnas Vivapure D Mini) para medir la cantidad de ARNpi libre en la muestra. Para las columnas de Sefarosa DEAE, se eluyeron formulaciones que contenían ARNpi a través de las columnas (altura de lecho ~ 2,5 cm, 1,5 cm de diámetro) equilibradas con HBS (NaCl 145 mM, HEPES 20 mM, pH 7,5). Se analizaron una alícuota de la muestra inicial y la eluida para determinar el contenido de lípidos y ARNpi mediante HPLC y A260, respectivamente. El porcentaje de encapsulación se calcula con base en la variación en la relación de ARNpi con respecto al lípido entre las muestras de la columna antes y después. Para los dispositivos centrífugos Vivapure, se eluyó una parte alícuota (0,4 mL, <1,5 mg / mL de ARNpi) de la formulación que contiene ARNpi a través de la membrana cargada positivamente por centrifugación (2.000 x g durante 5 min). Se analizaron alícuotas de las muestras antes y después del paso por la columna como se describió anteriormente para determinar la cantidad de ARNpi libre en la muestra.

## Determinación de la concentración de ARNpi

Se determinó la concentración de ARNpi midiendo la absorbancia a 260 nm después de la solubilización del lípido. Se solubilizó el lípido de acuerdo con el procedimiento descrito por Bligh y Dyer (Bligh, et al., Can. J. Biochem. Physiol. 37: 911 - 917 (1959)). En resumen, se mezclaron las muestras de formulaciones de ARNpi liposomal con cloroformo / metanol en una relación en volumen de 1 : 2,1 : 1 (muestra acuosa : metanol : cloroformo). Si la solución no era del todo clara (es decir, una sola fase, clara) después de la mezcla, se añadió una cantidad adicional de 50 - 100 mL (volumen registrado) de metanol y se mezcló nuevamente la muestra. Una vez que se obtuvo una monofase clara, se analizó la muestra a 260 nm usando un espectrofotómetro. Se determinó la concentración de ARNpi a partir de las lecturas de A260 usando un factor de conversión de aproximadamente  $45 \mu\text{g} / \text{mL} = 1,0 \text{ OD}$ , usando un paso de luz de 1,0 cm. El factor de conversión en la monofase de cloroformo / metanol / agua varía ( $35 - 50 \mu\text{g} / \text{mL} = 1,0 \text{ DO}$ ) para cada composición de lípidos y se determina empíricamente para cada formulación lipídica novedosa utilizando una cantidad conocida de ARNpi.

## Determinación de las concentraciones y proporciones de lípidos

Se midieron el colesterol, DSPC, PEG-lípido, y los diversos lípidos catiónicos contra estándares de referencia utilizando un sistema de HPLC Waters Alliance que consiste en un módulo de separaciones Alliance 2695 (automuestreador, bomba de HPLC, y calentador de columna), un detector de dispersión de luz por evaporación Waters 2424 (ELSD), y un software para HPLC Waters Empower (versión 5.00.00.00, número de compilación 1154; Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.). Las muestras (15  $\mu\text{L}$ ) que contenían 0,8 mg / mL de lípido total en etanol al 90% se inyectaron en una columna XBridge C18 de fase inversa con un empaquetamiento de 2,5  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 50 mm (Waters Corporation, Milford, MA, EE.UU.) calentada a 55  $^{\circ}\text{C}$  y se sometió a cromatografía con elución en gradiente a un caudal constante de 0,5 mL / min. La composición de la fase móvil cambió de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM : metanol (20:80) a THF:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM: metanol (16 : 4 : 80) durante 16 minutos. La presión del gas en el ELSD se fijó en 25 psi, mientras que el enfriador - calentador del nebulizador y la deriva de temperatura del tubo se fijaron en 100% y 85  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Las concentraciones de lípido medidas (mg / mL) se convirtieron en concentraciones molares, y las proporciones relativas de lípidos se expresaron como % en moles del lípido total en la formulación.

## Determinación de la eficiencia de encapsulación

Se determinaron las eficiencias de captura después de la remoción del ARNpi externo mediante diafiltración de flujo tangencial o cromatografía de intercambio de aniones. Se determinaron las concentraciones de ARNpi y de lípido (como se describe más arriba) en las mezclas iniciales de incubación de la formulación y después de diafiltración de flujo tangencial. La relación de ARNpi a lípido (peso / peso) se determinó en ambos puntos en el proceso, y la eficiencia de encapsulación se determinó tomando la relación de la proporción final e inicial de ARNpi con respecto al lípido y multiplicando el resultado por 100 para obtener un porcentaje.

Selección *in vivo* de lípidos catiónicos para la actividad de FVII

Se evaluó la actividad de FVII en los animales tratados con ARNpi de FVII a las 24 horas después de la inyección intravenosa (bolo) en ratones C57BL/6 o 48 horas después de la inyección intravenosa (bolo) en ratas SD. Se obtuvieron ratones C57BL/6 hembra de seis a ocho semanas de edad, a través de Charles River Laboratories y se aclimataron durante una semana antes de usarlos en los estudios. Los animales se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y todos los procedimientos con animales se realizaron de acuerdo con las directrices establecidas por el Consejo Canadiense de Cuidado de los Animales.

Se diluyeron sistemas de LN-ARNpi que contenían ARNpi del Factor VII a las concentraciones apropiadas en solución salina estéril amortiguada con fosfato inmediatamente antes de su uso, y las formulaciones se administraron por vía intravenosa a través de la vena lateral de la cola en un volumen total de 10 mL / kg. Después de 24 h, los animales fueron anestesiados con ketamina / xilazina y se recogió la sangre mediante punción cardiaca y se procesó hasta obtener el suero (tubos de separación de suero Microtainer; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EE.UU.). El suero se analizó inmediatamente o se almacenó a -70  $^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis para los niveles de Factor VII en suero.

Se midió el FVII utilizando un kit disponible comercialmente (Biophen FVII Kit<sup>MR</sup>; Aniara Corp., Mason, OH), siguiendo las instrucciones del fabricante en una escala de microplacas. Se determinó la reducción del FVII frente a los animales de control no tratados, y los resultados se expresaron como % de FVII residual. Se utilizaron típicamente cinco niveles de dosis (0,1; 0,3; 0,5; 1,0 y 3,0 mg / kg).

## Farmacocinética y análisis de hígado

Se utilizó ARNpi marcado en forma fluorescente (ARNpi marcado con luciferasa Cy-3, Alnylam Pharmaceuticals) para medir el contenido de ARNpi en el plasma y el hígado después de la administración de los sistemas de LN-ARNpi. Se hicieron las mediciones extrayendo primero Cy3-ARNpi de la matriz biológica que contenía proteína y luego se analizó la cantidad del marcador Cy-3 en el extracto por fluorescencia. Se utilizaron dos métodos de extracción, una mezcla de cloroformo / metanol para las muestras de plasma y una mezcla comercial de fenol / cloroformo (reactivo Trizol®) con las muestras de tejido.

Para el plasma, se recogió sangre en tubos Vacutainer que contenían EDTA y se centrifugó a 1.000 x g durante 10 min a 4-8 °C para aislar el plasma. Se transfirió el plasma a un tubo Eppendorf y se sometió a ensayo, ya sea inmediatamente o se almacenó en un congelador a -30 °C. Se diluyó una parte alícuota del plasma (máximo 100 µL) se diluyó hasta 500 µL con PBS (NaCl 145 mM, fosfato 10 mM, pH 7,5), se añadió metanol (1,05 mL) y cloroformo (0,5 mL), y se sometió a agitación tipo vórtice la muestra para obtener una solución clara de una sola fase. Después se añadió agua (0,5 mL) y cloroformo (0,5 mL) y se mantuvo la emulsión resultante mezclando periódicamente durante un mínimo de 3 minutos. La mezcla se centrifugó a 3.000 rpm durante 20 minutos y se transfirió la fase acuosa superior que contenía el marcador de Cy-3 a un nuevo tubo de ensayo. Se midió la fluorescencia de la solución usando un fluorímetro SLM a una longitud de onda de excitación de 550 nm (ancho de banda de 2 nm) y una longitud de onda de emisión de 600 nm (ancho de banda 16 nm). Se generó una curva estándar marcando las alícuotas de plasma de animales no tratados con la formulación que contenía Cy-3-ARNpi (0 a 15 µg / mL), y se procesó la muestra como se indicó anteriormente.

Para el hígado, se pesaron en forma precisa secciones (400 - 500 mg) de tejido de animales perfundidos con solución salina y se homogeneizaron en 1 mL de Trizol usando tubos FastPrep. Se transfirió una parte alícuota del homogeneizado (típicamente equivalente a 50 mg de tejido) a un tubo Eppendorf y se añadió Trizol adicional hasta 1 mL final. Se añadió cloroformo (0,2 mL), y se mezcló la solución y se incubó durante 2 - 3 minutos antes de ser centrifugada durante 15 min a 12.000 x g. Se diluyó una parte alícuota (0,5 mL) de la fase acuosa superior que contenía Cy-3 con 0,5 mL de PBS y se midió la fluorescencia de la muestra como se describió anteriormente.

#### 25 Medición de la proteína de FVII en suero

Se determinaron los niveles de Factor VII en suero utilizando el kit de ensayo colorimétrico Biophen VII (Anaira, EE.UU.). En resumen, se diluyeron en serie muestras de suero agrupadas de control (200% - 3,125%) y se analizaron las muestras de plasma apropiadamente diluidas de animales tratados utilizando el kit de Biophen VII de acuerdo con las instrucciones del fabricante en placas de análisis de poliestireno no enlazantes, fondo plano, de 96 pozos, (Corning, Corning, Nueva York) y se midió la absorbancia a 405 nm. Se generó una curva de calibración usando el suero de control diluido en forma serial y se usó para determinar los niveles de Factor VII en el suero de animales tratados.

#### Determinación de tolerabilidad

La tolerabilidad de partículas lipídicas de DLin-K-C2-DMA vacías (DLin-K-C2-DMA / DSPC / Chol / PEG-C-DOMG (40 / 10 / 40 / 10)) se evaluó mediante el control de cambio de peso, observaciones al lado de la jaula, química clínica y, en algunos casos, la hematología en ratas hembra Sprague Dawley y ratones hembra C57BL/6. Se registró el peso de los animales antes del tratamiento y a las 24 horas después del tratamiento intravenoso con diversas dosificaciones. Los datos se registraron como % de cambio en el peso corporal. Además de las mediciones de peso corporal, se obtuvo en cada nivel de dosis un panel de química clínica, incluyendo marcadores de la función hepática, a las 24 horas después de la inyección utilizando una parte alícuota de suero recolectado para el análisis del FVII. Las muestras fueron enviadas al Laboratorio Central para Veterinarios (Langley, BC) para su análisis. En algunos casos, se incluyeron animales adicionales en el grupo de tratamiento para permitir la recogida de sangre completa para el análisis de hematología.

#### Determinación *in situ* de pKa usando TNS

45 Las mediciones de pKa *in situ* se realizaron utilizando TNS como sonda fluorescente sensible al pH, utilizando una modificación del enfoque previamente publicado en Bailey, A. L. y Cullis, P. R., *Biochemistry* 33: 12573 - 12580 (1994).

#### Resultados

50 Se llevaron a cabo estudios iniciales en ratones hembra C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad en dos etapas. En la primera etapa, se comparó la actividad asociada con el lípido DLinDMA que sirve como punto de referencia con la actividad asociada con formas modificadas de DLinDMA. Esta etapa permitió la identificación de que DLin-K-DMA tiene una mayor actividad en comparación con DLinDMA. Por lo tanto, en la segunda etapa, se compararon las actividades de las formas modificadas de DLinDMA con la actividad de DLin-K-DMA. Se usaron curvas de respuesta a la dosis para estimar un ED<sub>50</sub> para cada formulación, que se define como la dosis de ARNpi requerida para reducir

la concentración de proteína del FVII en suero en un 50%, y es ~ 1,0 mg / kg para la formulación de referencia DLinDMA. La ED<sub>50</sub> para formulaciones con poca actividad se expresa como un intervalo, por ejemplo, 12 - 25 mg / kg, lo que indica que se presenta una reducción del 50% en los niveles de proteína del FVII en suero entre estas dosis de ARNpi. Si una formulación mostró una buena actividad (ED<sub>50</sub> < 2 mg / kg), entonces se repitió la respuesta a la dosis en un rango más estrecho de dosis y de cabeza a cabeza con DLinDMA para una mayor precisión comparativa.

Selección 1a: modificaciones del grupo de cabeza para DLinDMA y actividad del FVII *in vivo*

Para los propósitos de este estudio, se dividió DLinDMA en tres dominios estructurales clave que se modificaron por separado, incluyendo el grupo de cabeza, el enlazador, y las cadenas hidrocarbonadas. El grupo de cabeza de dimetilaminopropano es hidrofílica y contiene una función amina terciaria con un pKa aparente (*in situ*) de pH 6,4. En consecuencia, DLinDMA está casi completamente cargada a pH 4, el pH al cual los sistemas de LN-ARNpi se forman a través de la interacción electrostática con ARNpi. Mientras tanto, a pH 7,4, ~ 5 - 10% de las moléculas de DLinDMA se cargan, por lo tanto, la densidad de carga catiónica en la superficie de estas nanopartículas en la circulación es relativamente baja. En contraste, a un pH endosomal (pH ~ 5), la densidad de carga superficial aumenta significativamente, lo que se espera que promueva la formación de pares iónicos con fosfolípidos aniónicos y rompa la membrana endosomal (Hafez, I. M. y Cullis, P. R., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 4: 139 - 148 (2001) y Xu, Y. y Szoka, F. C., *Biochemistry* 35: 5616 - 5623 (1996)).

Las modificaciones del grupo de cabeza realizadas a DLinDMA se muestran en la Tabla 3, y las primeras tres fueron diseñadas para alterar la naturaleza de la carga positiva. DLinTMA contiene un grupo amino cuaternario y se carga de forma permanente, y mostró una actividad reducida con una DE<sub>50</sub> estimada entre 2 - 5 mg / kg. Se observó una disminución similar en la actividad cuando se reemplazó la función dimetilamina por una fracción piperazina (DLinMPZ, ED<sub>50</sub> 2 - 5 mg / kg), y se redujo más significativamente cuando se sustituyó por un grupo morfolino (DLinMA, ED<sub>50</sub> 12 - 25 mg / kg).

Una justificación para efectuar las dos modificaciones restantes se muestra en la Tabla 3 fue comparar las actividades de dos lípidos con estructuras similares al grupo de cabeza pero con diferentes tasas de metabolismo *in vivo*. No se midió la degradación del lípido *in vivo* para cualquiera de los lípidos seleccionados aquí, pero se espera que un grupo etoxi (DLin-EG-DMA) sería más resistente a la escisión enzimática que un grupo éster (DLinDAC) (Martin, B. et al., *Curr. Pharm. Des* 11: 375 - 394 (2005)); no obstante, ambos lípidos exhibieron actividad similar.

Tabla 3. Modificaciones del grupo de cabeza para DLinDMA

Nombre abreviado	Nombre químico	ED <sub>50</sub> (mg/kg)	Modificación del grupo de cabeza
DLinDMA (punto de referencia)	1,2-Dilinoleiloxi-3- dimetilaminopropano	-1	
DLinTMA.Cl	Cloruro de 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano	2 - 5	
DLinMPZ	1,2-Dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino) propano	2 - 5	
DLinMA	1,2-Dilinoleiloxi-3-morfolinopropano	12 - 25	

30

(continuación)

Nombre abreviado	Nombre químico	ED <sub>50</sub> (mg/kg)	Modificación del grupo de cabeza
DLin-EG-DMA	1,2-Dilinoileloxi-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano	5 - 12	
DLinDAC	1,2-Dilinoileloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano	5 - 12	

- 5 El radical etoxi se considera que es más resistente a la degradación que la mayoría de otros tipos de enlaces químicos *in vivo*, lo cual puede ser porque se ha encontrado que estos lípidos son menos tolerados que los lípidos catiónicos con enlaces éster, por ejemplo (Martin, B. et al., Curr. Pharm. Des 11: 375 - 394 (2005)). Se elaboraron una variedad de estos lípidos diseñados racionalmente, caracterizados, y analizados, incluyendo los que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Modificaciones del enlazador a DLinDMA

Nombre abreviado	Nombre químico	ED <sub>50</sub> (mg/kg)	Estructura
DLinDMA (punto de referencia)	1,2-Dilinoileloxi-3- dimetilaminopropano	~1	
DLinDAP	1,2-Dilinoileloxi-3-dimetilaminopropano	40 - 50	
DLin-2-DMAP	1-Lineoil-2-linoeiloxi-3-dimetilaminopropano	5 - 12	
DLin-C-DAP	1,2-Dilinoeílcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano	12 - 25	
DLin-S-DMA	1,2-Dilinoileiltio-3-dimetilamonopropano	12 - 25	
DLin-K-DMA	2,2-Dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano	~0,4	
R =			

10

La primera modificación enlistada en la Tabla 4 es DLinDAP, en la cual ésteres reemplazan los enlazadores etoxi de DLinDMA. Sorprendentemente, partículas lipídicas con ácido nucleico que comprenden ARN<sub>pi</sub> del Factor VII y que contienen DLinDAP demostraron una reducción significativa en la actividad *in vivo* en comparación con los que contienen DLinDMA (ED<sub>50</sub> 12 - 25 mg / kg), a pesar de su estructura muy similar a DLinDMA. Además, partículas

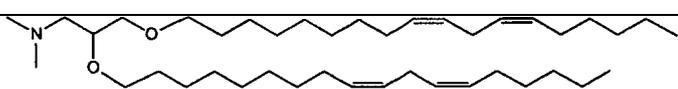
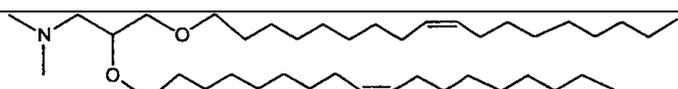
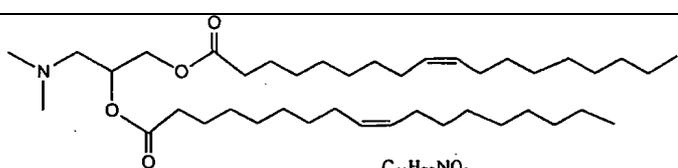
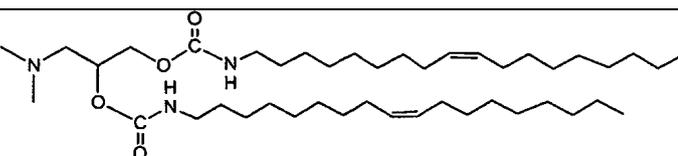
lipídicas que contiene ácido nucleico basadas en DLin-2-DMAP, un lípido con un enlace etoxi y un enlace éster, produjeron actividad intermedia entre las partículas lipídicas que contienen ácido nucleico basadas en DLinDMA y DLinDAP. Partículas lipídicas con ácido nucleico basadas en lípidos que contienen enlaces carbamato (DLin-C-DAP) o tioéter (DLin-S-DMA) también dieron como resultado una reducción drástica de la actividad *in vivo*.

- 5 La modificación final fue para insertar un enlazador de anillo de cetal, que introdujo interesantes cambios estructurales a la molécula de lípido. En primer lugar, se sabe que el cetal es más lábil en medio ácido que enlazadores etoxi (Martin, B. et al., Curr. Pharm. Des 11: 375 - 394 (2005)), lo que puede disminuir su vida media en la vía endocítica. En segundo lugar, las cadenas hidrocarbonadas se enlazaron ahora con el grupo enlazador a través de un único carbono. Curiosamente, la introducción de un enlazador de anillo de cetal en DLinDMA resultó en
- 10 partículas lipídicas con ácido nucleico que fueron ~ 2,5 veces más potentes en la reducción de los niveles de proteína del FVII en suero con respecto al punto de referencia DLinDMA, con una ED<sub>50</sub> (es decir, dosis para alcanzar el 50% de silenciamiento génico) de ~ 0,4 mg / kg frente a 1 mg / kg, respectivamente (Figura 2).

Selección 1c: Reduce la insaturación de cadenas hidrocarbonadas de DLinDMA, modificaciones diversas y la actividad de FVII *in vivo*

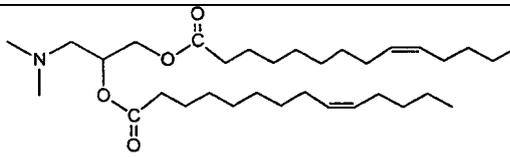
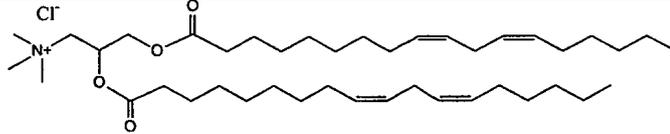
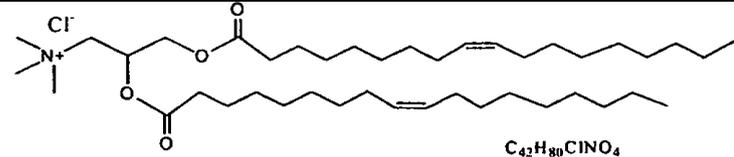
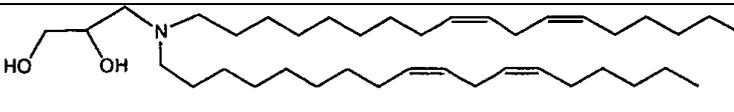
- 15 Se analizaron una variedad de otros lípidos catiónicos que contienen modificaciones en comparación con DLinDMA en el sistema de destrucción del Factor VII. Por ejemplo, la propensión de las moléculas de lípidos a adoptar fases no bicapa invertidas se sabe que aumenta con el aumento de insaturación de la cadena hidrocarbonada (Cullis, P. R., et al., Chem. Phys. Lipids 40: 127 - 144 (1986)). Dada la hipótesis de que la formación de estas fases no bicapa es causante de una alteración del endosoma y la liberación de ARNpi en el citoplasma y la observación de que la actividad de SNALP *in vitro* también aumenta con el aumento de la insaturación (Heyes, J. et al., J. Control Release 107: 276 - 287 (2005)), era de interés observar qué pasó con la potencia de LN-ARNpi *in vivo* cuando DLinDMA, que contiene dos cadenas C18:2 fue reemplazado por DODMA, con dos cadenas C18:1. Estos lípidos catiónicos y los resultados de estos experimentos se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Modificaciones diversas al grupo de cabeza, el enlazador y las cadenas hidrocarbonadas

Nombre abreviado	ED <sub>50</sub> (mg / kg)	Modificación
DLinDMA (Punto de referencia)	~1	 <p>1,2-Dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano</p>
DODMA	2 - 5	 <p>1,2-Dioleiloxi-3-dimetilaminopropano</p>
DODAP	> 25	 <p>C<sub>21</sub>H<sub>77</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 1,2-Dioleoil-3-dimatilaminopropano</p>
DO-C-DAP	> 10	 <p>1,2-Dioleoilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano</p>

25

(continuación)

Nombre abreviado	ED <sub>50</sub> (mg / kg)	Modificación
DMDAP	> 10	 <p>Cloruro de 1,2-Diiristoleoil-3-trimetilaminopropano</p>
DLinTAP.Cl	> 25	 <p>Cloruro de 1,2-Dilinoileiloxi-3-trimetilaminopropano</p>
DOTAP.CL	> 25	 <p>C<sub>42</sub>H<sub>80</sub>ClNO<sub>4</sub></p> <p>Cloruro de 1,2-Dioleoil-3-trimetilaminopropano</p>
DLinAP	5 - 12	 <p>3(N,N-Dilinoileilamino)-1,2-propanodiol</p>

Como se muestra en la Tabla 5, DODMA fue de 2 a 5 veces menos activo que el más insaturado DLinDMA, y la sustitución de enlaces éter por ésteres (DODAP) disminuyó la actividad más de 25 veces.

- 5 Las cadenas C18:1 enlazadas a carbamato (DO-C-DAP) también fueron una combinación inactiva a una concentración de 10 mg / kg, la dosis máxima ensayada. Se sintetizó DMDAP para determinar si las cadenas hidrocarbonadas C14:1 más cortas podrían permitir que el lípido enlazado a través del lípido mejorado se mezcla con la membrana endosomal objetivo (MUI, B. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1467: 281 - 292 (2000)); sin embargo, no se observó actividad para DMDAP-LN-ARNpi en el modelo del FVII hasta una dosis máxima de 10 mg / kg. Los
- 10 lípidos enlazados a éster permanentemente cargados, DLinTAP y DOTAP fueron de interés, ya que este último lípido es uno de los lípidos catiónicos más comúnmente utilizados para la transfección. Sin embargo, en el modelo LN-ARNpi, ninguno de estos lípidos enlazados a éster mostró ningún signo de actividad, (ED<sub>50</sub> > 25 mg / kg). El último lípido representó un cambio estructural radical con DLinDMA, en el que se invirtió el grupo de cabeza de dimetilpropano y las cadenas hidrocarbonadas se enlazaron directamente al nitrógeno del amino, dejando un grupo de cabeza dihidroxi; sin embargo, DLinAP mostró una pobre actividad con un ED<sub>50</sub> en el rango de 5 - 12 mg / kg.
- 15

En resumen, las modificaciones crecientes a DLinDMA identificaron con éxito DLin-K-DMA como un lípido catiónico que es significativamente más potente que DLinDMA cuando se analizó cabeza a cabeza en el mismo modelo *in vivo* y la formulación LN-ARNpi.

Selección 2a: modificaciones del grupo de cabeza con DLin-K-DMA y actividad del FVII *in vivo*

- 20 Dada la importancia de la carga positiva en el mecanismo de acción se investigaron las hipótesis que guían el diseño de lípidos, los efectos de los cambios estructurales en el grupo de cabeza a base de amina en el contexto de DLin-K-DMA como el nuevo lípido que sirve de punto de referencia. Se realizaron una serie de modificaciones del grupo de cabeza, se caracterizaron, y se analizaron para explorar el efecto del tamaño, la constante de disociación ácida, y el número de grupos ionizables (Tabla 6).

Tabla 6. Modificaciones del grupo de cabeza con DLin-K-DMA

Nombre abreviado	Nombre químico	ED <sub>50</sub> (mg / kg)	Modificación
DLin-K-DMA  (Punto de referencia)	2,2-Dilinoleil-4-dimetilamino metil-[1,3]-dioxolano	~0.4	
DLin-K-MPZ	2,2-Dilinoleil-4-N-metil piperazino-[1,3]-dioxolano	-1.5	
DLin-K-MA	2,2-Dilinoleil-4-N- morfolino-[1,3]-dioxolano	>15	
DLin-K-TMA.Cl	Cloruro de 2,2-Dilinoleil-4- trimetilamino-[1,3]-dioxolano	>5 <sup>a</sup>	
DLin-K <sup>2</sup> -DMA	2,2-Dilinoleil-4,5-bis (dimetilamino metil)-[1,3]-dioxolano	-0.4	
DLin-K-C2-DMA	2,2-Dilinoleil -4-(2-dimetil aminoetil)-[1,3]-dioxolano	~0.1	
DLin-K-C3-DMA	2,2-Dilinoleil -4-(3-dimetil aminopropil)-[1,3]-dioxolano	~0.6	
DLin-K-C4-DMA	2,2-Dilinoleil -4-(4-dimetil aminobutil)-[1,3]-dioxolano	>3	
R =			
<sup>a</sup> No se observó actividad con 5 mg / kg y fue letal con la siguiente dosis de 15 mg / kg			

5 DLin-K-DMA contiene un carbono quiral en la posición 4 de la estructura de anillo de cetol. Por lo tanto, se sintetizaron los dos enantiómeros ópticamente puros (+) y (-) y se compararon sus actividades con aquella de la mezcla racémica. Todas las tres formulaciones exhibieron respuestas indistinguibles a la dosis, cada una con una ED<sub>50</sub> ~ 0,3 mg / kg.

10 Las tres primeras modificaciones enumeradas en la Tabla 6 también se aplicaron a DLinDMA en la selección 1, la introducción de las fracciones amino de piperazino (DLin-K-MPZ) y morfolino (DLin-K-MA) para modificar las características de la carga positiva ionizable, y también la conversión de la dimetilamina terciaria en la amina cuaternaria cargado de forma permanente de DLin-K-TMA. Aunque todas estas modificaciones disminuyeron significativamente la actividad, es interesante observar que DLin-K-MPZ, con una ED<sub>50</sub> ~ 1,5, fue casi tan activo como DLinDMA pero aproximadamente 5 veces menos activa que DLin-K-DMA, y la misma modificación a DLinDMA redujo su actividad por un factor similar. Además, la función amina de morfolino volvió inactivo a DLin-K-MA a la dosis máxima ensayada (15 mg / kg) similar a DLinMA, que tiene una ED<sub>50</sub> de 12 - 25 mg / kg. Otra observación a tener en cuenta es que DLin-K-TMA (carga positiva permanente) es tóxico. No se observó actividad con 5 mg / kg, pero los animales experimentaron una pérdida de peso significativa (datos no mostrados) y no sobrevivieron a la siguiente dosis con 15 mg / kg.

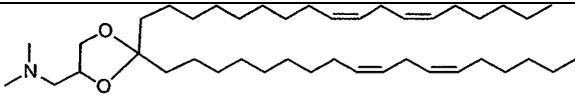
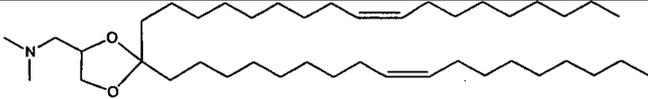
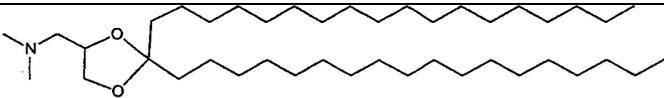
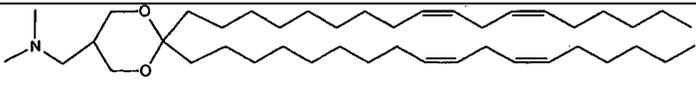
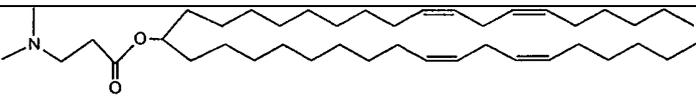
La modificación abreviada como DLin-K<sup>2</sup>-DMA indica la presencia de dos fracciones dimetilamina. Dentro del error, este lípido tenía la misma actividad que DLin-K-DMA, a pesar del grupo de cabeza más grande.

5 Como un parámetro adicional, se varió la distancia entre el grupo dimetilamino y el enlazador dioxolano mediante la introducción de grupos metileno adicionales. Los tres lípidos restantes estaban estrechamente relacionados en su estructura, y se sintetizaron para determinar qué efecto tenía el distanciamiento de la carga positiva del anillo dioxolano sobre la actividad. Este parámetro puede afectar tanto a la  $pK_a$  del grupo de cabeza de amina, así como la distancia y la flexibilidad de la presentación carga con relación a la interfaz de la bicapa lipídica. La inserción de un solo grupo metileno adicional en el grupo de cabeza (DLJn-K-C2-DMA) produjo un aumento espectacular de potencia con relación a DLin-K-DMA. La  $ED_{50}$  para este lípido era  $\sim 0,1$  mg / kg, por lo que es 4 veces más potente que DLin-K-DMA y 10 veces más potente que el punto de referencia DLinDMA cuando se comparó cabeza a cabeza en el modelo del FVII (Figura 2A). Grupos adicionales de metileno disminuyeron la actividad presentándose una reducción significativa entre DLin-K-C3-DMA ( $ED_{50} \sim 0,6$  mg / kg) y DLin-K-C4-DMA ( $ED_{50} > 3$  mg / kg) (Figura 2B).

Selección 2b: Modificaciones al grupo de cabeza, el enlazador y las cadenas hidrocarbonadas de DLin-K-DMA y la actividad de FVII *in vivo*

15 Una serie de modificaciones estructurales adicionales realizadas a DLin-K-DMA se presentan en la Tabla 7. Los tres primeros de la serie confirmaron la importancia de la instauración de la cadena hidrocarbonada para la actividad *in vivo*. Se observó una disminución progresiva de las  $ED_{50}$  desde  $\sim 0,3$ ,  $\sim 1,0$  y  $\sim 8,0$  mg / kg al pasar de DLin-K-DMA (C18:2) hasta DO-K-DMA (C18:1) y DS- K-DMA (C18:0), respectivamente. La siguiente modificación (DLin-K6-DMA) demostró que el anillo de cetral de 5 miembros de DLin-K-DMA podría ser sustituido por una estructura de anillo de dioxolano de 6 miembros sin pérdida de actividad. El lípido final que se muestra en la Tabla 7 representa una modificación más radical. DLin-M-DMA no tiene un enlazador de anillo de cetral, pero las cadenas hidrocarbonadas aún se enlazan directamente con un solo carbono. Curiosamente, este lípido se mantuvo relativamente activo con una  $ED_{50} \sim 0,7$  mg / kg.

Tabla 7. Modificaciones diversas al grupo de cabeza, el enlazador y las cadenas hidrocarbonadas de DLin-K-DMA

Nombre abreviado	$ED_{50}$ (mg / kg)	Modificación
DLin-K-DMA (Punto de referencia)	$\sim 1$	 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano
DO-K-DMA	$\sim 1,0$	 2,2-dioleoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano
DS-K-DMA	$\sim 8,0$	 2,2-distearoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano
DLin-K6-DMA	$\sim 0,3$	 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano
DLin-M-DMA	$\sim 0,7$	 Dilinoilmeti-3-dimetilaminopropionato

Comparación de la actividad *in vivo* de formulaciones lipídicas con ácido nucleico en ratones y ratas

La capacidad de diversas formulaciones lipídicas con ácidos nucleicos que comprenden diferentes lípidos catiónicos fue explorada adicionalmente en ratones y ratas. Se prepararon cada una de las formulaciones lipídicas con ácido nucleico como se describió anteriormente utilizando PEG-C-DOMG como el PEG-lípido. Las formulaciones inicialmente analizadas (que incluían ya sea DLin-K-DMA, DLin-K-MPZ, DLin-K-C2-DMA, o DLin-K-C4-DMA) redujeron los niveles residuales de FVII tanto en ratones (Figura 3) como en ratas (Figura 4). Sin embargo, la formulación DLin-K-C2-DMA mostró una capacidad notablemente mejorada para reducir los niveles de FVII tanto en ratones como en ratas. La actividad de la formulación de DLin-K-C2-DMA era aproximadamente 2 a 3 veces mayor que la formulación de DLin-K-DMA en ratones, y aproximadamente 10 - 20 veces mayor que la formulación de DLin-K-DMA en ratas. Una comparación de la reducción de FVII en ratones y en ratas utilizando la formulación de DLin-K-DMA o la formulación de DLin-K-C2-DMA se muestra en la Figura 5. Las formulaciones que tienen DLin-K-C4-DMA o DLin-K-MPZ (MPZ) como el lípido catiónico mostraron actividad similar entre sí y con la formulación de DLinDMA.

La formulación liposómica que tiene DLin-K6-DMA como el lípido catiónico también se analizó en comparación con DLin-K-C2-DMA y DLin-K-DMA. La formulación de DLin-K6-DMA redujo los niveles de FVII en ratones de manera similar a DLin-K-DMA, como se muestra en la Figura 6.

Farmacocinética y la acumulación hepática de formulaciones catiónicas de LN-ARNpi

La correlación entre los niveles de ARNpi suministrados al hígado y la reducción del FVII se determinó mediante la encapsulación de ARNpi marcado con Cy-3 en la selección de los sistemas de LN-ARNpi que cubren un espectro de actividades *in vivo* que se muestra en la Tabla 8. Se midió la fluorescencia de Cy-3 en plasma y tejido hepático 0,5 y 3,0 h después de la inyección. Los datos del plasma indicaron una amplia variedad de tasas de eliminación en un primer momento, pero para la mayoría de las formulaciones, se recuperaron 20 - 50% de la dosis inyectadas de ARNpi en el hígado en un lapso de 0,5 h, ya sea que fueran altamente activas o exhibieran pobre actividad. Las formulaciones más activas, DLinDMA y DLin-K-DMA, mostraron niveles relativamente altos de ARNpi en el hígado a las 0,5 h, 50% y 32% respectivamente. Todas las formulaciones mostraron una disminución en el hígado de los niveles de Cy-3 después de 3 h, lo que refleja presumiblemente el metabolismo. Este estudio sugiere que el suministro en bruto solo al hígado no explica las diferencias en la actividad.

Tabla 8. Concentraciones en plasma y en hígado de Cy-3 ARNpi para una selección de sistemas activos e inactivos de LN-ARNpi que contienen lípido catiónico

Lípido	0,5 h (dosis inyectada en %)		0,3 h (dosis inyectada en %)		ED <sub>50</sub> (mg / kg)
	Plasma	Hígado	Plasma	Hígado	
DLin-K-DMA	1,1	32,0	0,4	4,0	0,3
DLinDMA	15,3	50,0	0,7	17,0	1,0
DLinMPZ	20,3	52,0	0,4	37,5	2 - 5
DLinAP	86,2	11,5	23,1	5,0	5 - 12
DLin-2-DMAP	17,5	20,5	8,8	2,5	5 - 12
DLinDAC	27,1	29,0	0,3	6,5	12 - 25
DLinDAP	46,6	20,5	3,3	16,5	12 - 25
DLin-C-DAP	69,4	28,5	19,0	13,5	12 - 25
DLin-S-DMA	10,7	2,5	5,4	0	12 - 25
DLinMA	20,2	10,5	0,4	4,5	12 - 25

30 Tolerabilidad de sistemas de LN-ARNpi que contienen DLin-K-C2-DMA

5 Las ratas a las que se les administró la formulación liposomal que contiene DLin-K-C2-DMA mostraron una pérdida de peso dependiente de la dosis. A las ratas a las que se les administró 91 mg / kg parecieron normales y tenían hígados normales. A las ratas a las que se les administró 182 mg / kg mostraron un movimiento más lento y un pelaje desaliñado. Sus hígados eran ligeramente pálidos, y uno de los tres hígados mostró un ligero moteado. De las ratas a las que se les administró 364 mg / kg, una murió, y se mostraron encorvadas, de movimiento lento, ojos entrecerrados, pelajes desaliñados, pelo erizado, orina roja / anaranjada, con hígados pálidos y algunos moteados. Las ratas mostraron un aumento significativo en ALT / AST, tan bajos como 182 mg / kg de lípido.

Los resultados histopatológicos de hígados obtenidos de ratas tratadas con 91 mg / kg ("5" mg / kg) fueron normales.

10 Los hígados de ratas tratadas con 182 mg / kg ("10" mg / kg) mostraron una necrosis hepatocelular, centrolobular, y vacuolización hepatocelular leve a moderada. Uno de los hígados de las ratas supervivientes tratadas con 364 mg / kg ("20" mg / kg) mostró necrosis hepatocelular moderada, centrolobular, y el otro mostró necrosis hepatocelular leve a moderada, difusa (no concentrada en la región centrolobular) con inflamación leve.

15 Los ratones tratados con la formulación liposomal de DLin-K-C2-DMA también mostraron una pérdida de peso dependiente de la dosis, aunque ninguno de los ratones murió. Los ratones también mostraron un incremento superior a 10 veces en ALT-AST con aproximadamente 1.100 mg / kg de lípido. Sin embargo, los ratones no mostraron signos clínicos evidentes, excepto con valores superiores a 1300 mg / kg, donde el ratón exhibió encorvamiento, movimiento más lento y un pelaje desaliñado.

20 La introducción de un enlazador de cetil no apareció impartir ningún problema de toxicidad significativo en los ratones y, de hecho, los sistemas de LN que contienen DLin-K-DMA y que encapsulan ARNpi del FVII eran extraordinariamente bien tolerado en los ratones. Los datos presentados en la Tabla 9 son de un estudio diseñado para determinar los rangos de dosificación adecuados, y se alcanzaron dosis únicas extremas, de lípido y ARNpi. Los criterios de toxicidad medidos fueron cambio en % en los niveles de peso corporal y en suero de los marcadores enzimáticos hepáticos, ALT y AST.

25 Tabla 9. Parámetros de tolerabilidad claves para los sistemas de LN-ARNpi que contienen DLin-K-DMA en ratones con dosis extremas

ARNpi (mg / kg)	Lípido total (mg / kg)	Cambio en % del peso corporal	ALT (IU/L)	AST (IU/L)
0 - 10	0 - 164	0	45	90
46	750	-5,0	174	340
61	1000	-4,5	448	816
76	1250	-5,5	1771	4723
92	1500	-6,0	4723	2094

30 En comparación con los controles en solución salina, no se observaron cambios en la química sanguínea o el peso corporal hasta una dosis de ARNpi de 10 mg / kg, lo cual para esta formulación era > 30 veces mayor que la dosis ED<sub>50</sub>.

35 Se administró una dosis masiva de ARNpi de 46 mg / kg (150 veces más que la ED<sub>50</sub>) antes de que se midieran signos de toxicidad significativos. Esta dosis de ARNpi se traduce en una dosis lipídica total de 750 mg / kg en una relación de ARNpi a lípido de 0,06 (p / p). Incluso con estos niveles, los aumentos de ALT y AST en suero fueron relativamente modestos (<10 veces el valor normal), y no es hasta que las dosis de ARNpi exceden de 61 mg / kg que se observan aumentos severos (> 10 veces). La dosis máxima analizada fue de 92 mg / kg de ARNpi, equivalente a 1.500 mg de lípido total / kg. Los animales perdieron 6% de peso corporal, pero no se produjeron muertes con ninguna de las dosis ensayadas.

Caracterización de partículas lipídicas con ácido nucleico

40 Las características de las formulaciones lipídicas con ácido nucleico seleccionadas se resumen en la Tabla 10, en donde C2 indica que el lípido catiónico es DLin-K-C2-DMA; C4 indica que el lípido catiónico es DLin-K-C4-DMA; y

MPZ indica que el lípido catiónico es DLin-K-MPZ. Cada una de las formulaciones descritas más abajo contenían PEG-C-DOMG como el PEG-lípido.

Tabla 10. Características de las formulaciones que contienen diferentes aminolípidos

Formulación	Relación final de lípido (% en moles)				Tamaño de partícula (nm)	Relación final D/L (p/p)*	% de ARNpi libre
	Cat	DSPC	Chol	PEG-C-DOMG			
C2	37,4	11,5	41,3	9,8	72 ± 23	0,037	7,8
C4	37,9	9,6	42,8	9,7	64 ± 15	0,058	1,2
MPZ	ND	ND	ND	ND	71 ± 21	0,056**	5,1

\* Con base en el material encapsulado; \*\* estimado a partir de los resultados de DSPC, Chol, PEG-C-DOMG

## 5 Los pKa aparentes de lípidos catiónicos clave medidos *in situ* en formulaciones de LN-ARNpi

10 Dos parámetros importantes subyacentes en el diseño de lípidos son el pKa del lípido catiónico ionizable y las capacidades de estos lípidos, cuando están protonados, para inducir una estructura de fase no bicapa (hexagonal H<sub>II</sub>) cuando se mezcla con lípidos aniónicos. El pKa del lípido catiónico ionizable determina la carga de la superficie sobre la LNP bajo diferentes condiciones de pH. El estado de carga a pH fisiológico (por ejemplo, en la circulación) puede influir en el comportamiento de adsorción de proteína en el plasma, la eliminación de la sangre y la distribución en los tejidos (Semple, S. C., et al., Adv. Drug Deliv Rev 32: 3 - 17 (1998)), mientras que el estado de carga a pH ácido (por ejemplo, en los endosomas) puede influir en la capacidad de la LNP para combinarse con lípidos aniónicos endógenos para formar estructuras no bicapa endosomolíticas (Hafez, I. M., et al., Gene Ther 8: 1188 - 1196 (2001)). En consecuencia, la capacidad de estos lípidos para inducir la estructura de fase H<sub>II</sub> en mezclas con lípidos aniónicos es una medida de su capacidad de desestabilización de la bicapa y el potencial endosomolítico relativo.

20 La sonda fluorescente de ácido 2-(p-toluidino)-6-naftaleno sulfónico (TNS), que exhibe una mayor fluorescencia en un entorno hidrófobo, puede ser utilizada para evaluar la carga de la superficie en bicapas lipídicas. Las valoraciones de la carga de la superficie en función del pH se pueden utilizar para determinar el pKa aparente (en lo sucesivo denominado como pKa) de los lípidos constituyentes (Cullis, P. R., et al., Chem. Phys Lipids 40: 127 - 144 (1986)). Usando este enfoque, se determinaron los valores de pKa para partículas lipídicas con ácido nucleico que contienen diversos lípidos catiónicos y se resumen en la Tabla 11. La capacidad relativa de la forma protonada de ciertos lípidos catiónicos ionizables para inducir la estructura de fase H<sub>II</sub> en lípidos aniónicos se determinó mediante la medición de la temperatura de transición de la bicapa con respecto a H<sub>II</sub> hexagonal (T<sub>BH</sub>) en mezclas equimolares con diestearoilfosfatidilserina (DSPS) a pH 4,8, utilizando RMN <sup>31</sup>P (Cullis, P. R. y de Kruijff, B., Biochim Biophys Acta 513: 31 - 42 (1978)) y análisis de calorimetría diferencial de barrido (DSC) (Expand, R. M. et al., Biochemistry 28: 9398 - 9402 (1989)). Ambas técnicas produjeron resultados similares.

30 Los datos presentados en la Tabla 11 indican que el lípido altamente activo DLin-K-C2-DMA tiene valores de pKa y T<sub>BH</sub> que son teóricamente favorables para el uso en sistemas de suministro de ARNpi. El pKa de 6,4 indica que las LNP basados en DLin-KC2-DMA tienen una carga superficial limitada en circulación, pero se convertirán en positivamente cargados en endosomas. Además, la T<sub>BH</sub> para DLin-K-C2-DMA es 7 °C más baja que la de DLinDMA, lo que sugiere que este lípido ha mejorado la capacidad desestabilizadora de la bicapa. Sin embargo, los datos también demuestran que pKa y T<sub>BH</sub> no explican por completo la actividad *in vivo* de lípidos utilizados en las LNP. Por ejemplo, DLin-K-C3-DMA y DLin-K-C4-DMA tienen valores de pKa y T<sub>BH</sub> idénticos, sin embargo DLin-KC4-DMA es más de 5 veces menos activo *in vivo*. Por otra parte, DLin-K-C2-DMA y DLin-K-C4-DMA, que tienen valores de pKa y T<sub>BH</sub> muy similares, exhiben una diferencia > 30 veces en la actividad *in vivo*. Por lo tanto, mientras que los parámetros biofísicos de pKa y T<sub>BH</sub> son útiles para guiar el diseño del lípido, los resultados presentados en la Tabla 11 apoyan la estrategia de analizar variantes de lípidos principales, incluso los que tienen valores de pKa y T<sub>BH</sub> muy similares.

40

Tabla 11. Los pKa de lípidos catiónicos clave medidos *in situ* en vesículas preformadas mediante valoraciones de fluorescencia de TNS

Lípido catiónico	pKa aparente	Temperatura de transición de H <sub>II</sub> (°C)	ED <sub>50</sub> del FVII (mg / kg)
DLin-K-C3-DMA	6,8	18	~0,6
DLin-K-C4-DMA	6,8	18	> 3,0
DLinDMA	6,4	27	~1,0
DLin-K-C2-DMA	6,4	20	~0,1
DLin-K6-DMA	6,2	n.d.	~0,3
DLin-K-MPZ	6,2	n.d.	~1,5
DLinDAP	5,7	26	> 25
DLin-K-DMA (mezcla racémica)	5,6	n.d.	~0,3
DLin-K-MA	5,6	n.d.	> 15
DLin-K-DMA	5,6	19	~0,4

5 Como se muestra más arriba, la potencia de los sistemas de LN-ARNpi que contienen 40% en moles DLin-K-C2-DMA era tal que cantidades tan pequeñas como ~100 picomoles de ARNpi encapsulado administradas como un único bolo en forma intravenosa a un ratón era suficiente para derribar las concentraciones en suero de proteína del FVII en un 50% dentro de las 24 h posteriores a la inyección.

10 En este estudio, las relaciones de los componentes lipídicos y de ARNpi con respecto al lípido se mantuvieron constantes para todas las formulaciones, de modo que cualquier diferencia en la carga de la superficie puede ser atribuida al pK<sub>a</sub> del lípido catiónico. La relación de ARNpi con respecto al lípido utilizado en la selección de actividad fue de 0,06 peso / peso, lo que significa que la carga positiva era mayor a la carga negativa. La neutralización de la carga para las formulaciones que contienen 40% en moles de lípido catiónico monobásico se produce en una proporción de aproximadamente 0,17 peso / peso. En consecuencia, suponiendo que un lípido catiónico forma un par iónico con cada carga negativa en la cadena principal de ARNpi, entonces, aproximadamente 35% del lípido catiónico total estaba asociado con ARNpi dentro de la nanopartícula y, por lo tanto, no podría contribuir a la carga de la superficie. Curiosamente, el aumento de la proporción de ARNpi con respecto al lípido por encima de ~0,08 (peso / peso) en una formulación 40 / 10 / 40 / 10 disminuía la potencia de los sistemas de LN-ARNpi (datos no presentados). Se ha reportado una respuesta similar para el ARNpi suministrado *in vivo* utilizando nanopartículas lipídicas (A. Akinc, M. et al., Mol. Ther. (2009) y puede reflejar la importancia del lípido catiónico libre (lípido no asociado con ARNpi) y / o la dosis total de lípido catiónico inyectada.

25 Una de las observaciones más notables fue la dependencia de la actividad sobre el grado de insaturación de la cadena de carbohidrato. Tanto para DLinDMA como para DLin-K-DMA, hubo una disminución significativa en la potencia para cada disminución en el número de dobles enlaces. Sin desear estar limitado por la teoría, se propone que el lípido catiónico sintético (activo) insertado en la membrana endosomal y los fosfolípidos aniónicos endógenos (tales como fosfatidilserina) forman pares iónicos (Hafez, I. M., et al., Gene Ther. 8: 1188 - 1196 (2001) y Xu, Y. y Szoka, F. C., Biochemistry 35: 5616 - 5623 (1996)). La neutralización de la carga resultante reduce efectivamente el área de la sección transversal de los grupos de cabeza combinados, que corresponde a una disminución sustancial en su radio de curvatura intrínseco. La aplicación de los argumentos de la forma molecular empleados para describir el polimorfismo de los lípidos, significa que los lípidos catiónicos y aniónicos van desde una forma cilíndrica que adoptan en aislamiento hasta una forma de cono formada por el par iónico neutro. Los lípidos de forma cilíndrica son compatibles con la estructura bicapa, mientras que los lípidos en forma de cono que no lo son (Cullis, P. R. et al., Chem. Phys. Lipids 40: 127 - 144 (1986) y Hafez, I. M. y Cullis, P. R., Adv. Drug Deliv. Rev. 47: 139 - 148 (2001)), prefieren adoptar fases lipídicas invertidas, tales como la fase hexagonal H<sub>II</sub>, que alteran la estructura bicapa. Como consecuencia de ello, la membrana del endosoma se lisa, lo que permite que el ARNpi acceda al citoplasma donde se puede acoplar a RISC y escindir el ARNm del FVII.

Los resultados descritos aquí son consistentes con el concepto de forma introducido anteriormente, ya que la adición de dobles enlaces cis a una longitud de cadena dada aumenta el área de la sección transversal barrida por los grupos metilo terminales, promoviendo así la geometría de cono. La propensión a adoptar estructuras no bicapa cuando se emparejan con los fosfolípidos aniónicos es también una razón plausible de por qué la familia de los lípidos que contienen cetil es tan activa. Ambas cadenas hidrocarbonadas enlazadas a través de un único carbono en el enlazador de anillo de cetil, el ángulo del enlace tetraédrico tenderá a ensanchar la separación de las cadenas lo que favorece una forma de cono.

### Ejemplo 17

Eficacia y tolerabilidad de la formulación de DLin-K-C2-DMA SNALP

10 La eficacia y la tolerabilidad de las partículas lipídicas con ácido nucleico que comprenden DLin-K-C2-DMA fue validada adicionalmente en el contexto de las partículas lipídicas con ácido nucleico formuladas para el suministro de ARNpi *in vivo*, denominado KC2-SNALP. Estas partículas comprenden una proporción diferente de lípidos que las partículas lipídicas con ácido nucleico preparadas con PFV descritas en el Ejemplo 16.

15 Se encapsularon ARNpi en SNALP usando un proceso controlado de dilución por etapas descrito por Jeffs et al. (Pharm Res. 22: 362 - 372 (2005)). Los constituyentes lipídicos de KC2-SNALP eran DLin-KC2-DMA (lípidos catiónicos), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL), colesterol sintético (Sigma, St. Louis, MO) y PEG-C-DMA usados en una relación molar de 57,1 : 7,1 : 34,3 : 1,4, respectivamente. Tras la formación de las partículas cargadas, se dializaron las SNALP frente a PBS y se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 µm antes de usarlas. Los tamaños promedio de partícula fueron de 75 - 85 nm y 90 - 95% del ARNpi se encapsuló dentro de las partículas lipídicas. La relación final de lípidos con respecto a ARNpi en las formulaciones utilizadas para los ensayos *in vivo* fue de aproximadamente 6,5:1 (peso : peso).

20 La formulación de KC2-SNALP mostró una notable mejora en la potencia en el modelo del FVII de ratón en comparación con la formulación de DLin-K-C2-DMA que se describe en el Ejemplo 16. La ED<sub>50</sub> medida disminuyó desde ~0,1 mg / kg para la formulación de lípidos con ácido nucleico DLin-K-C2-DMA descrita en el Ejemplo 16 hasta ~0,02 mg / kg para la formulación de KC2-SNALP (Figura 8A). También se encontró que KC2-SNALP exhibe una potencia similar en ratas (datos no mostrados).

25 Además de la eficacia, la tolerabilidad es otro atributo crítico de un sistema de suministro adecuado de partículas lipídicas con ácido nucleico para uso en humanos, así que se estudió la tolerabilidad de una dosis única de KC2-SNALP en ratas. Se encontró que las dosis cerca del nivel de dosis eficaz eran muy bien toleradas (datos no mostrados); por lo tanto, se llevaron a cabo estudios de escalamiento de la dosis única a partir de dosis ~50 veces superiores (1 mg / kg) que la ED<sub>50</sub> observada de la formulación. Para entender la toxicidad de la formulación en ausencia de cualquier toxicidad o efectos farmacológicos resultantes de silenciamiento objetivo, estos experimentos se llevaron a cabo utilizando la secuencia de ARNpi de control no objetivo dirigida contra luciferasa descrita en el Ejemplo 16. Se observaron diariamente los signos clínicos, y los pesos corporales, la química del suero, y se midieron los parámetros hematológicos a las 72 horas después de la dosis. Como se muestra en la Tabla 12, KC2-SNALP fue muy bien tolerado con los altos niveles de dosis examinados (con relación a la dosis ED<sub>50</sub> observada) independientemente de la dosis, cambios clínicamente significativos en los parámetros clave de la química de suero o parámetros hematológicos.

Tabla 12. Parámetros de química clínica y hematología en ratas

Vehículo	Dosis de ARNpi (mg / kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Bilirrubina total (mg/dL)	BUN (mg/dL)	RBC (x 10 <sup>6</sup> / $\mu$ L)	Hemoglobina (g / dL)	WBC (x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)	PLT (x 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L)
PBS		56 $\pm$ 16	109 $\pm$ 31 100 $\pm$ 14	2 $\pm$ 0	4.8 $\pm$ 0.8	5.5 $\pm$ 0.3	11.3 $\pm$ 0.4 11.6 $\pm$ 0.6	11 $\pm$ 3	166 $\pm$ 177 1000 $\pm$ 272
KC2-SNALP	1	58 $\pm$ 22	81 $\pm$ 10	2 $\pm$ 0	4.4 $\pm$ 0.6	5.6 $\pm$ 0.2	11.6 $\pm$ 0.3	13 $\pm$ 2	1271 $\pm$ 269
KC2-SNALP	2	73 $\pm$ 9	100 $\pm$ 30	2,2 $\pm$ 0,4	4.3 $\pm$ 0.6	5.9 $\pm$ 0.3	11,9 $\pm$ 0,4	13 $\pm$ 4	958 $\pm$ 241
KC2-SNALP	3	87 $\pm$ 19		2 $\pm$ 0	5.0 $\pm$ 0.8	6.0 $\pm$ 0.2		15 $\pm$ 2	

**Ejemplo 18**

Eficacia y tolerabilidad *in vivo* de KC2-SNALP en primates

5 Dado el perfil prometedor de actividad y seguridad observado en roedores en el estudio descrito en el Ejemplo 17, se llevaron a cabo estudios en primates no humanos para investigar la traducción de la actividad de DLin-KC2-DMA en especies superiores. Para estos estudios, se utilizó transtiretina (TTR), un gen hepático de alto interés terapéutico.

10 Se trataron monos cynomolgus con una sola infusión intravenosa durante 15 minutos de siTTR formulado con KC2-SNALP con una dosis ARNpi de 0,03, 0,1, 0,3 y 1 mg / kg. Los animales de control recibieron una sola infusión intravenosa durante 15 minutos de PBS o ARNpi de ApoB formulado con KC2-SNALP con una dosis de 1 mg / kg. Todos los ARNpi fueron sintetizados por Alnylam y se caracterizaron por espectrometría de masas por electroaspersión y HPLC de intercambio aniónico. Las secuencias para las cadenas sentido y antisentido del FVII, ApoB, y los ARNpi de control han sido reportadas (Akinc, A. et al., Nat. Biotechnology 26: 561 - 569 (2008)). Las secuencias para las cadenas sentido y antisentido del ARNpi de TTR fueron las siguientes:

siTTR sentido: 5' –GuAAccAAGAGuAuuccAuTT -3' (SEQ ID NO: 37); y

15 siTTR antisentido: 5' –AUGGAAuACUCUUGGUuACTT -3' (SEQ ID NO: 38),

con los nucleótidos modificados con 2'-O-Me mostrados en minúsculas. Los ARNpi fueron generados por la hibridación de cantidades equimolares de cadenas sentido y antisentido.

20 Los tejidos se recogieron 48 horas después de la administración, y se determinaron los niveles de ARNm en hígado de TTR. Se obtuvo una respuesta clara a la dosis con un ED<sub>50</sub> aparente de ~0,3 mg / kg (Figura 8B). Un análisis toxicológico indicó que el tratamiento fue bien tolerado a las dosis ensayadas, sin cambios relacionados con el tratamiento en la apariencia o comportamiento de los animales. No se observaron alteraciones clínicamente significativas dependientes de la dosis, en los parámetros clave hematológicos o de química clínica (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de química clínica, y hematología en los NHP

Tratamiento	Dosis de ARNpi (mg/kg)	ALT (U / L)	AST (U / L)	Bilirrubina total (mg / dL)	BUN (mg/dL)	RBC (x 10 <sup>6</sup> / μL)	Hemoglobina (g / dL)	WBC (x 10 <sup>3</sup> / μL)	PLT (x 10 <sup>3</sup> / μL)
PBS	-	54 ± 25	51 ± 27	0,3 ± 0,1	27 ± 4	4,6 ± 0,5	13,8 ± 0,6	17,6 ± 3,0	515 ± 70
siApoB	1	42 ± 11	49 ± 12	0,3 ± 0,1	23 ± 3	6,0 ± 0,2	14,2 ± 0,9	13,6 ± 3,7	508 ± 49
siTTR	0,03	57 ± 11	47 ± 12	0,1 ± 0	15 ± 4	4,8 ± 0,4	11,5 ± 0,9	10,9 ± 2,2	495 ± 105
siTTR	0,1	50 ± 22	63 ± 47	0,13 ± 0,1	20 ± 3	5,0 ± 0,0	11,1 ± 0,4	12,9 ± 3,3	528 ± 22
siTTR	0,3	67 ± 8	66 ± 18	0,1 ± 0	21 ± 6	5,1 ± 0,2	11,0 ± 0,5	11,1 ± 5,5	529 ± 72
siTTR	1	47 ± 5	43 ± 7	0,13 ± 0,1	19 ± 1	4,9 ± 0,1	10,9 ± 0,4	10,7 ± 1,6	477 ± 34

25 En resumen, se empleó un enfoque de diseño racional para el descubrimiento de nuevos lípidos para su uso en sistemas de LNP de próxima generación para suministrar compuestos terapéuticos de ARNi. Usando este enfoque, se describieron importantes consideraciones relacionados con estructura - actividad para los lípidos catiónicos ionizables, y se diseñaron y caracterizaron múltiples lípidos con base en la estructura de DLinDMA. Una formulación de SNALP del lípido de mejor desempeño (DLin-K-C2-DMA) fue bien tolerada tanto por roedores como por primates no humanos y exhibió actividad *in vivo* con dosis de ARNpi tan bajas como 0,01 mg / kg en roedores, así como silenciamiento de un gen terapéuticamente significativo (TTR) en primates no humanos. En particular, el silenciamiento de TTR logrado en este trabajo (ED<sub>50</sub> ~ 0,3 mg / kg), representa una mejora significativa en la actividad en relación con los reportes anteriores de silenciamiento mediado por LNP-ARNpi en primates no humanos. La eficacia observada en este estudio, a nuestro entender, representa el más alto nivel de potencia observado para un ARNi terapéutico en primates no humanos hasta la fecha, y pone de relieve el progreso considerable que se ha hecho tanto en tecnologías de ARNi como de suministro.

Listado de secuencias

<110> Tekmira Pharmaceutical Corporation The University of British Columbia Hope, Michael J. Semple, Sean C. Chen, Jianxin Madden, Thomas D. Cullis, Pieter R. Ciufolini, Marco A.

<120> AMINOLÍPIDOS MEJORADOS Y MÉTODOS PARA EL SUMINISTRO DE ÁCIDOS NUCLEICOS

5 <130> 480208.461PC

<140> PCT

<141> 2009-10-09

<150> US 61/104.219

<151> 2008-10-09

10 <150> US 61/104.212

<151> 2008-10-09

<150> US 61/220.666

<151> 2009-06-26

<160> 38

15 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico

<400> 1

tccatgacgt tctgacgtt 20

<210> 2

25 <211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico

30 <400> 2

taacgttgag gggcat 16

<210> 3

<211> 16

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico

<400> 3

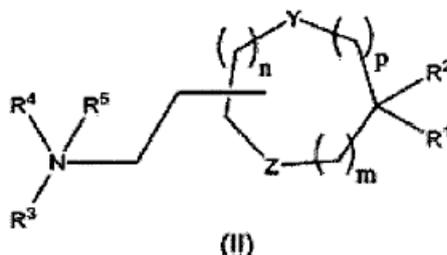
taagcatacg ggggtg 16

<210> 4

10 <211> 16

REIVINDICACIONES

1. Un aminolípido que tiene la siguiente estructura (II):



o sales del mismo, en donde

5  $R^1$  y  $R^2$  son o bien iguales o diferentes y son independientemente alquilo  $C_{12} - C_{24}$  sustituido, alqueno  $C_{12} - C_{24}$  opcionalmente sustituido, alquino  $C_{12} - C_{24}$  opcionalmente sustituido, o acilo  $C_{12} - C_{24}$  opcionalmente sustituido;

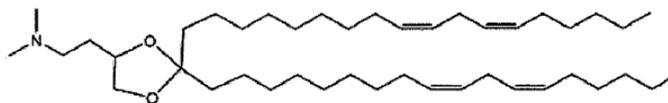
10  $R^3$  y  $R^4$  son o bien iguales o diferentes y son independientemente alquilo  $C_1 - C_6$  opcionalmente sustituido, alqueno  $C_1 - C_6$  opcionalmente sustituido, o alquino  $C_1 - C_6$  opcionalmente sustituido, o  $R^3$  y  $R^4$  se pueden unir para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos escogidos entre nitrógeno y oxígeno;

$R^5$  está o bien ausente o es hidrógeno o alquilo  $C_1 - C_6$  para proporcionar una amina cuaternaria;

$m$ ,  $n$ , y  $p$  son o bien iguales o diferentes y son independientemente 0 o 1 con la condición de que  $m$ ,  $n$ , y  $p$  no sean simultáneamente 0;

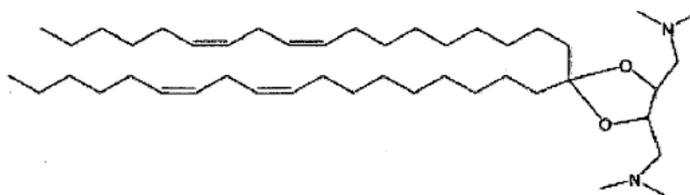
$Y$  y  $Z$  son o bien iguales o diferentes e independientemente O, S, o NH.

15 2. El aminolípido de la reivindicación 1, que tiene la estructura:

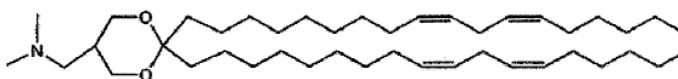


DLin-K-C2-DMA.

3. Un aminolípido que tiene una de las siguientes estructuras:



DLin-K<sup>2</sup>-DMA o



DLin-K6-DMA.

20 4. Una partícula lipídica que comprende un aminolípido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde opcionalmente y preferiblemente, la partícula comprende además un lípido neutro y un lípido capaz de reducir la

agregación de partículas; y en donde opcionalmente y preferiblemente además, en donde la partícula lipídica comprende:

(i) DLin-K-C2-DMA;

(ii) un lípido neutro seleccionado de DSPC, POPC, DOPE, y SM;

5 (iii) colesterol; y

(iv) un PEG-lípido,

en una relación molar de alrededor de 20 - 60% de DLin-K-DMA: 5 - 25% de lípido neutro: 25 - 55 % de colesterol: 0,5 - 15% de PEG - lípido.

10 5. La partícula lipídica de la reivindicación 4 que comprende además un agente terapéutico; en donde opcionalmente y preferiblemente, el agente terapéutico es un ácido nucleico; y

en donde opcionalmente y preferiblemente además, el ácido nucleico es un plásmido, o un oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico.

15 6. La partícula lipídica de la reivindicación 5, en donde el ácido nucleico se selecciona de entre el grupo que consiste de: un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y una ribozima; opcionalmente, en donde el ácido nucleico es un ARNpi.

7. Una composición farmacéutica que comprende la partícula lipídica de cualquiera de las reivindicaciones 4, 5 o 6 y un excipiente, portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

20 8. Un método *in vitro* de modular la expresión de un polipéptido por una célula, que comprende proporcionar a una célula la partícula lipídica de cualquiera de las reivindicaciones 4 - 7, en el que, opcionalmente y preferiblemente, el agente terapéutico se selecciona de un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNpi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en el que el ARNpi, microARN, o ARN antisentido comprende un polinucleótido que se enlaza específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento de los mismos, de tal manera que se reduce la expresión del polipéptido; en el que  
25 opcionalmente y más preferiblemente, el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de tal manera que se incrementa la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento de los mismos.

30 9. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno **caracterizado por** la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, comprendiendo el método proporcionar al sujeto la composición farmacéutica, en donde el agente terapéutico se selecciona de un ARNpi, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNpi, un microARN, o un oligonucleótido antisentido, y en donde el ARNpi, microARN, o ARN antisentido comprenden un polinucleótido que se enlaza específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

35 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno **caracterizado por** una menor expresión de un polipéptido en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un plásmido que codifica al polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 7 para uso en un método para inducir una respuesta inmune en un sujeto, en donde el agente terapéutico es un oligonucleótido estimulador del sistema inmunológico.

12. La composición farmacéutica para uso en la reivindicación 11, en donde se proporciona la composición farmacéutica al paciente en combinación con una vacuna o un antígeno.

40 13. Una vacuna que comprende la partícula lipídica de la reivindicación 5 y un antígeno asociado con una enfermedad o un patógeno.

14. La vacuna de la reivindicación 13, en donde dicho antígeno es un antígeno tumoral.

15. La vacuna de la reivindicación 13, en donde dicho antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano, o un antígeno de un parásito.

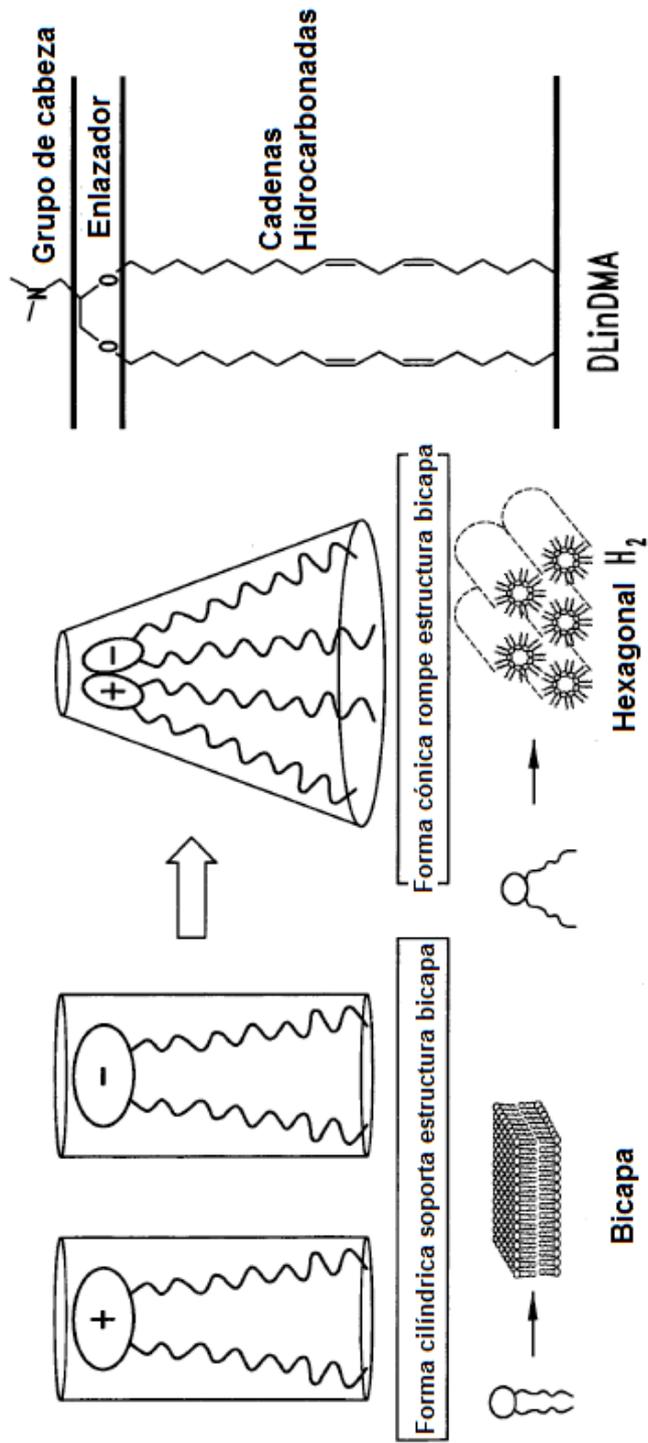


FIG. 1

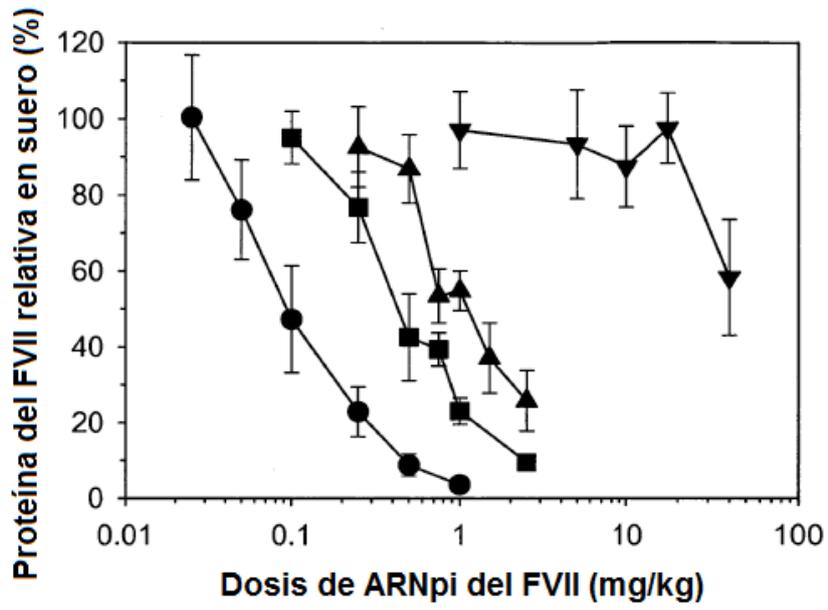


FIG. 2A

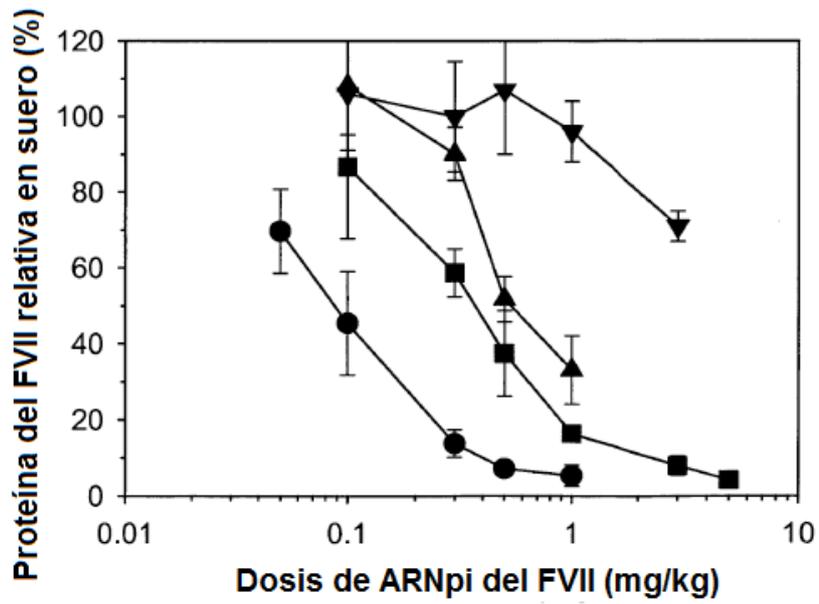


FIG. 2B

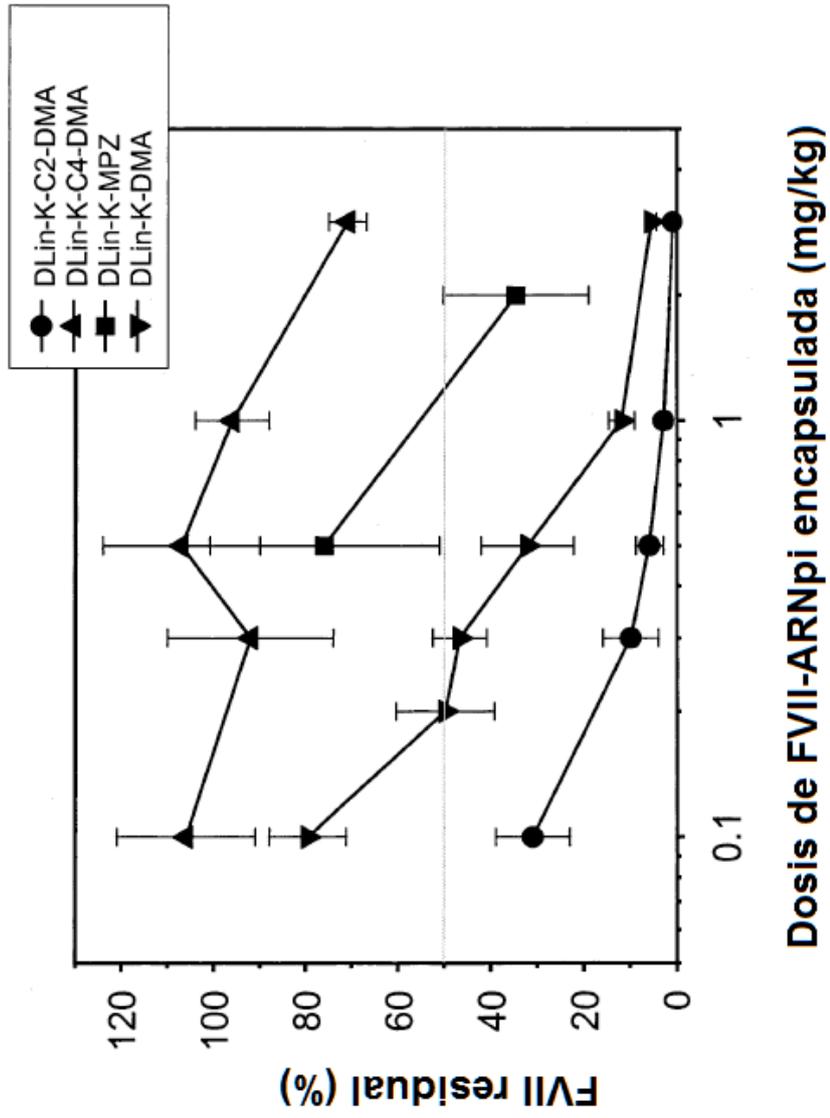
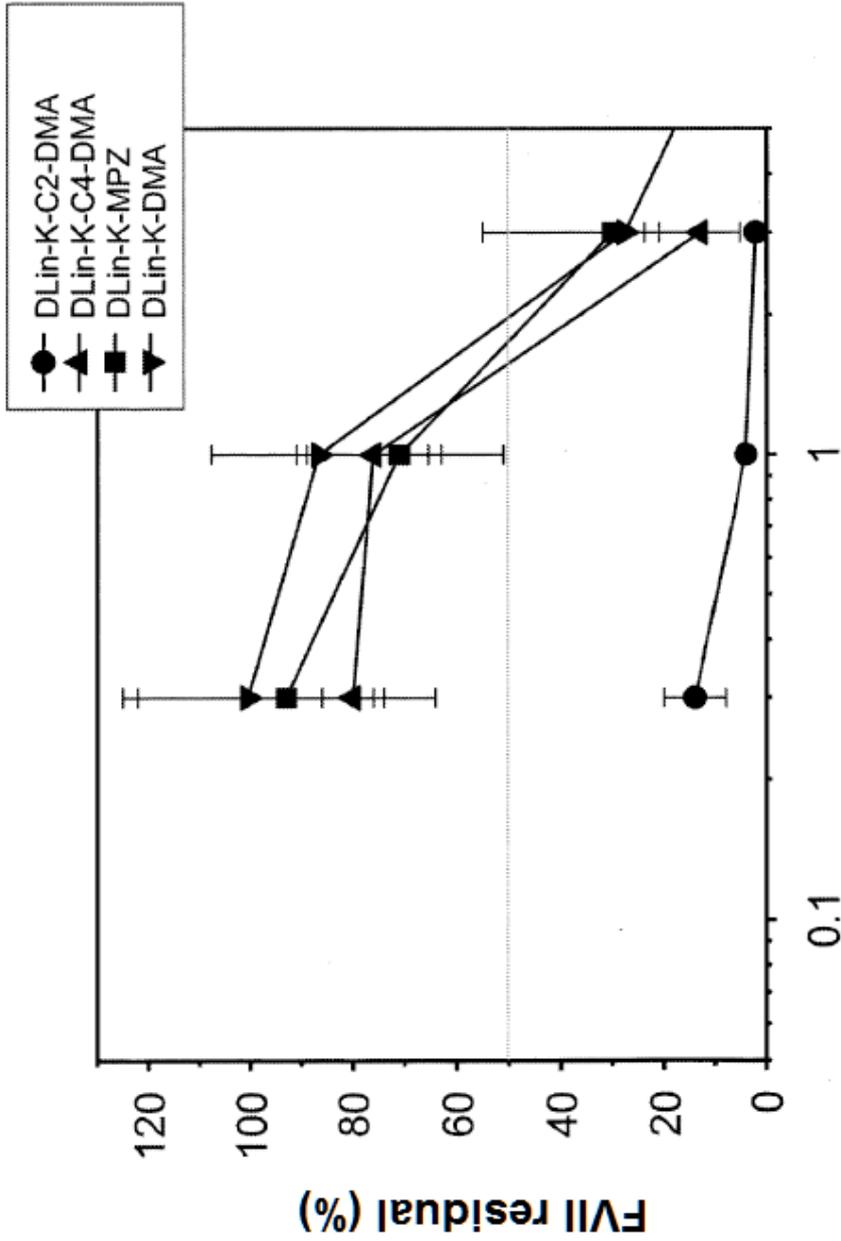


FIG. 3



Dosis de FVII-ARNpi encapsulada (mg/kg)

FIG. 4

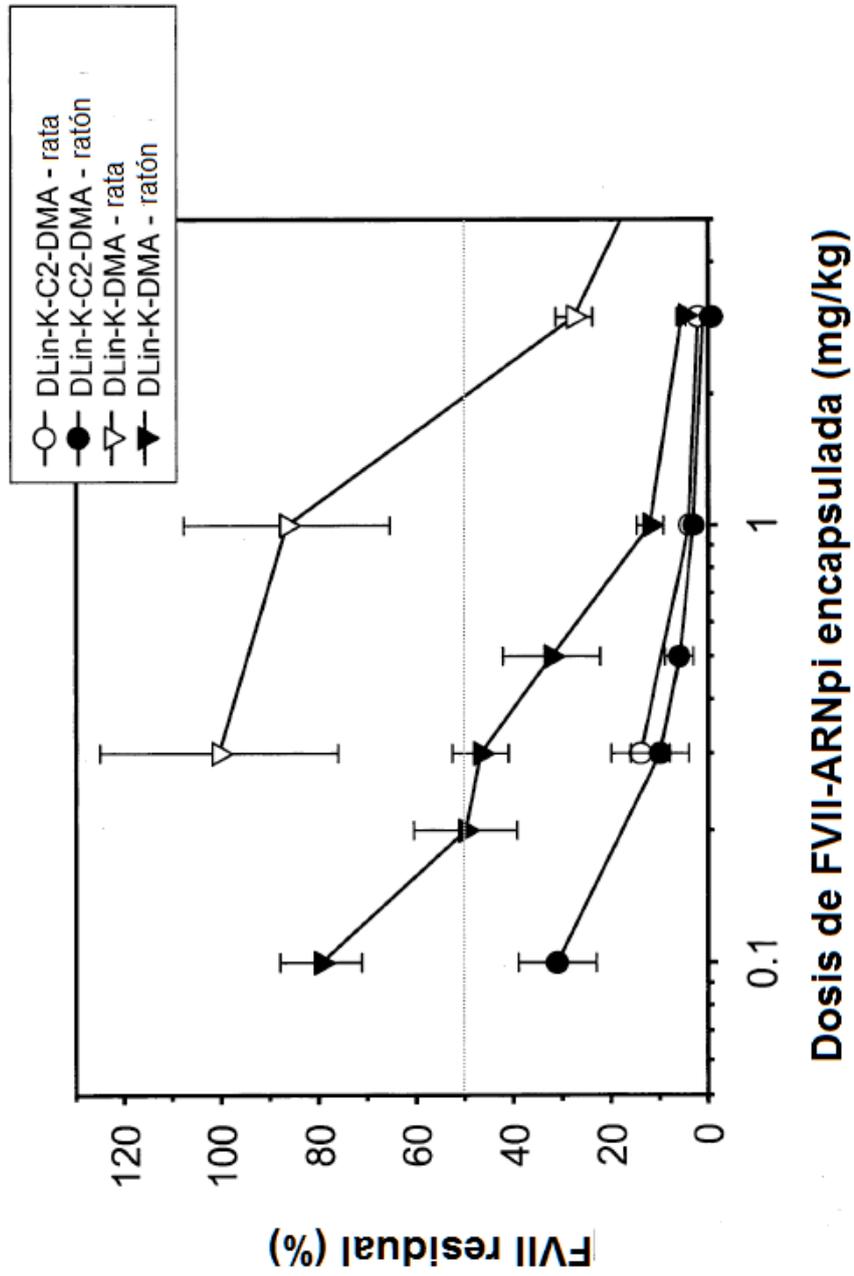
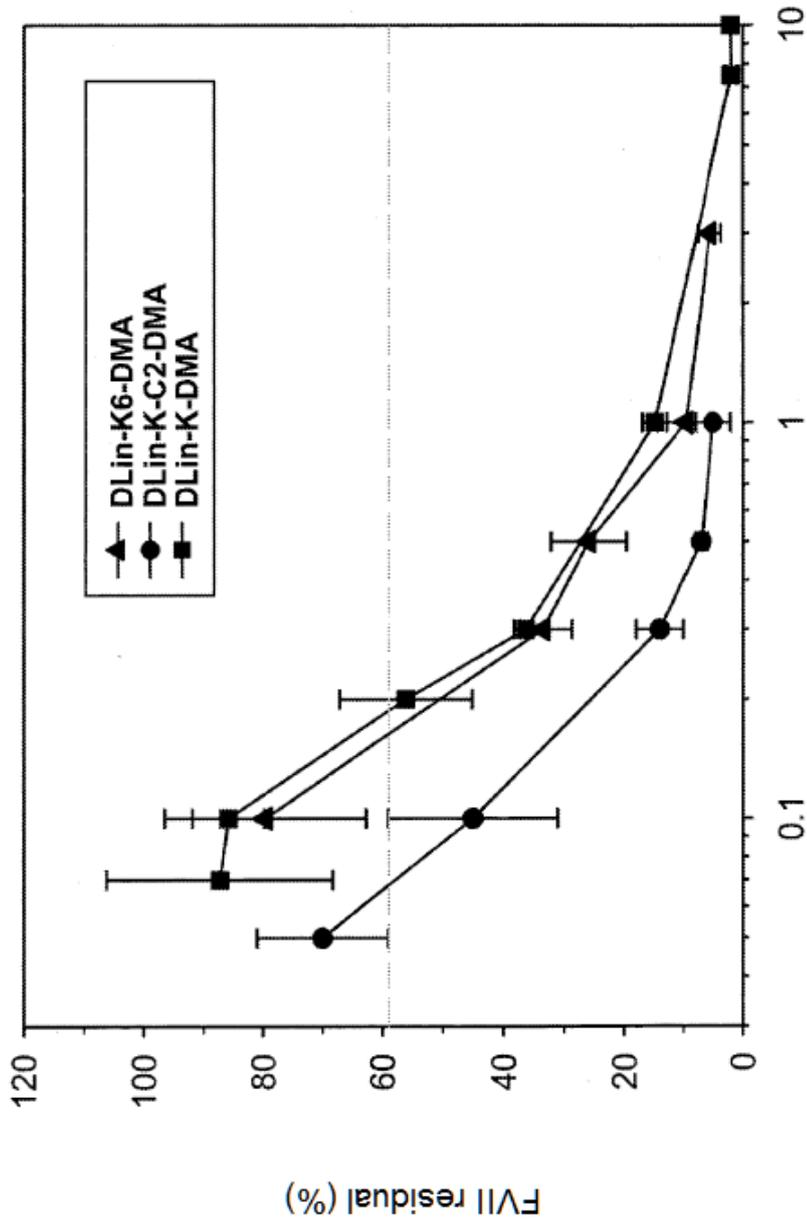


FIG. 5



Dosis de FVII-ARNpi encapsulada (mg/kg)

FIG. 6

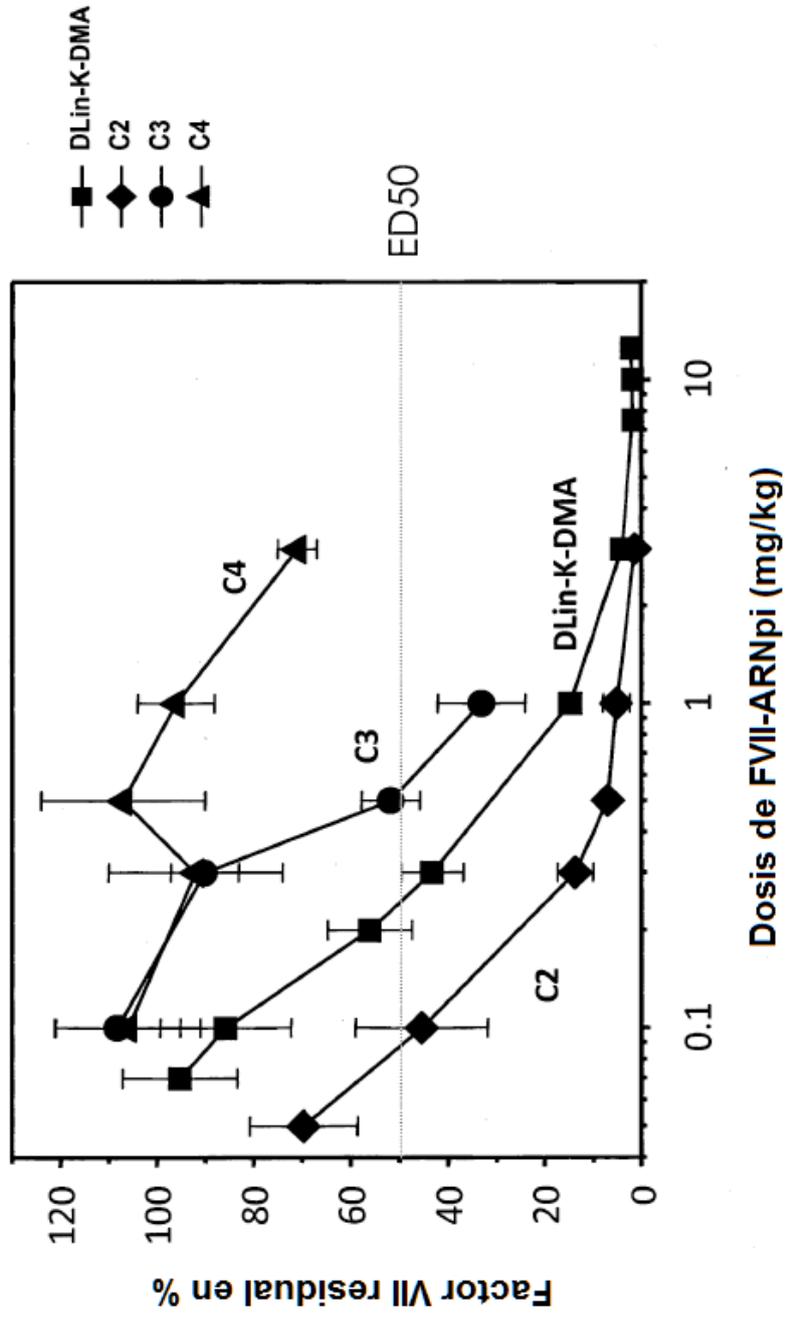


FIG. 7

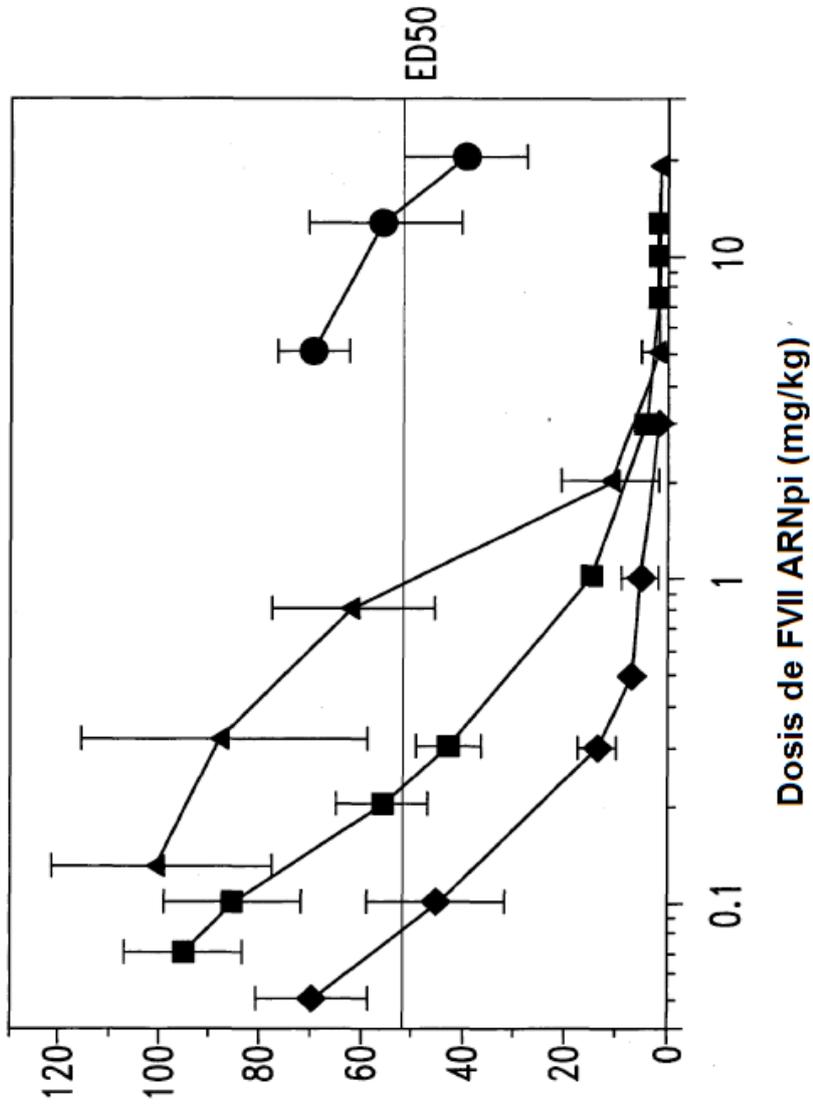


FIG. 8

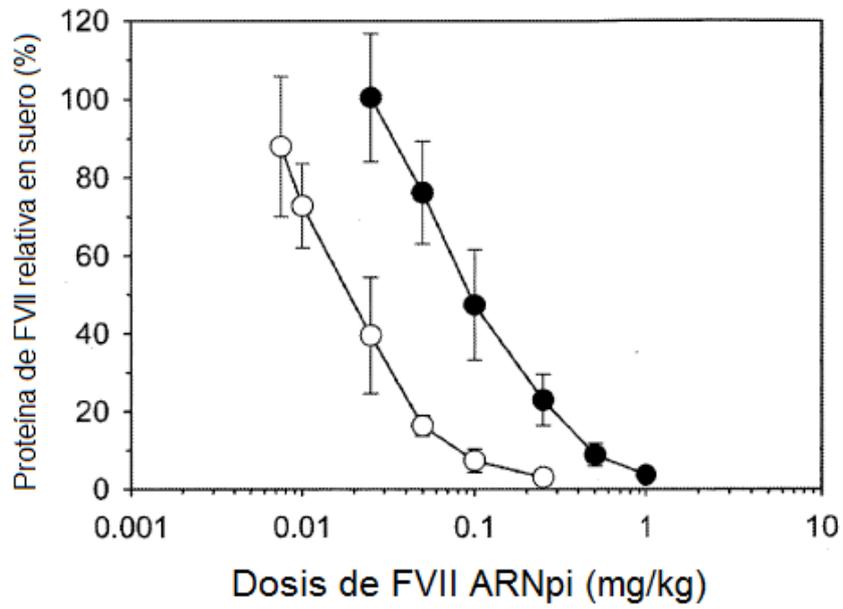


FIG. 9A

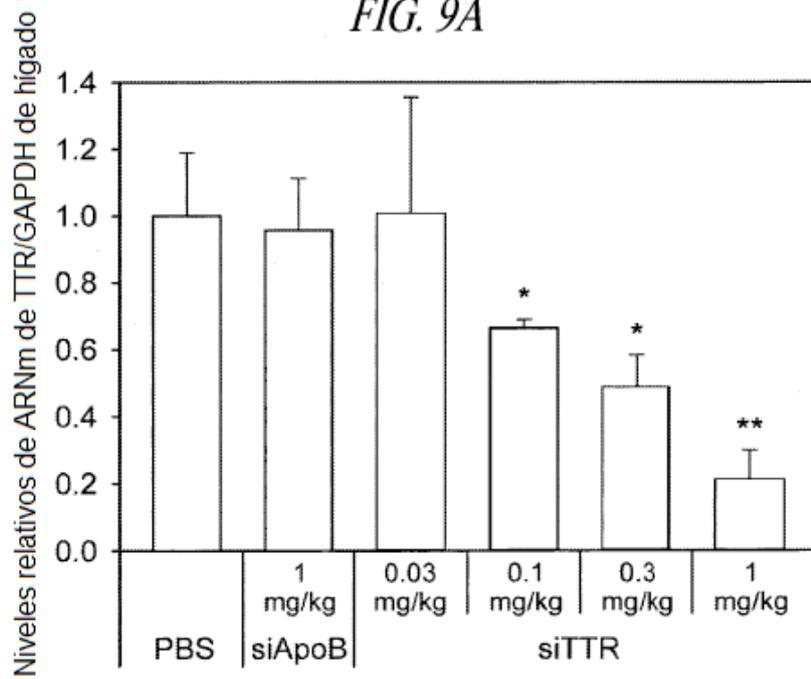


FIG. 9B