

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 535 419**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08867007 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015 EP 2238251**

54 Título: **Silenciamiento de expresión de quinas tipo polo usando ARN interferente**

30 Prioridad:

27.12.2007 US 17075 P

15.04.2008 US 45228 P

26.09.2008 US 100653 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.05.2015

73 Titular/es:

PROTIVA BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
100-8900 Glenlyon Parkway
Burnaby, British Columbia V5J 5J8, CA

72 Inventor/es:

MACLACHLAN, IAN y
JUDGE, ADAM

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 535 419 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

Silenciamiento de expresión de quinasa tipo polo usando ARN interferente

5 Antecedentes de la invención

La proliferación celular y la muerte celular programada desempeñan tareas importantes en el crecimiento y desarrollo de un organismo. En enfermedades proliferativas tales como cáncer, los procesos de proliferación celular y/o muerte celular programada a menudo están alterados. Por ejemplo, una célula cancerosa puede tener división celular no regulada a través de sobreexpresión de un regulador positivo del ciclo celular o la pérdida de un regulador negativo del ciclo celular, quizá por mutación. Como alternativa, una célula cancerosa puede haber perdido la capacidad de experimentar muerte celular programada a través de la sobreexpresión de un regulador negativo de la apoptosis. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos que restauren los procesos de control en puntos determinados y muerte celular programada en células cancerosas.

La interferencia de ARN (iARN) es un proceso evolutivamente conservado en que el reconocimiento de ADN bicatenario (ARNbc) finalmente conduce a supresión post-transcripcional de expresión génica. Esta supresión está mediada por ARNbc corto, también llamado ARN interferente pequeño (ARNip), que induce degradación específica de ARNm a través de apareamiento de bases complementario. En varios sistemas modelo, esta respuesta natural se ha desarrollado en una herramienta poderosa para la investigación de la función génica (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188-200 (2001); Hammond et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2:110-119 (2001)). Más recientemente, se descubrió que la introducción de dúplex de ARNbc sintéticos de 21 nucleótidos en células de mamífero podría silenciar de forma eficaz la expresión génica. Aunque el mecanismo preciso aún no está claro, la iARN ofrece un nuevo modo para inactivar genes de interés. En particular, para el tratamiento de trastornos neoplásicos tales como cáncer, la iARN proporciona un nuevo enfoque potencial para modular (por ejemplo, reducir) la expresión de ciertos genes, por ejemplo, una molécula anti-apoptótica, un factor de crecimiento, un receptor de factor de crecimiento, una proteína del huso mitótico, una proteína del ciclo celular, un factor angiogénico, un oncogén, un transductor de señales intracelulares, una chaperona molecular, y combinaciones de los mismos.

Una de estas dianas es el gen de la quinasa 1 tipo polo (PLK-1), que codifica un miembro de una familia de serina/treonina proteína quinasas conocidas como quinasas tipo polo (véase, por ejemplo, Nigg, *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10:776-783 (1998)). En eucariotas, la progresión regulada a través del ciclo celular está controlada por un grupo de genes cuya expresión fluctúa en todo el ciclo. Las quinasas dependientes de ciclina y subunidades reguladoras asociadas, las ciclinas, son los reguladores principales del ciclo celular. Estos complejos heterodiméricos actúan fosforilando dianas corriente abajo que, a su vez, desencadenan eventos de señalización que liberan proteínas nucleares necesarias para entrar en posteriores fases del ciclo celular. Las quinasas tipo polo tales como PLK-1 contribuyen a la activación e inactivación de estos complejos heterodiméricos.

Según progresan las células a través del ciclo celular, las quinasas tipo polo experimentan fluctuaciones en abundancia, actividad, y localización para controlar múltiples fases del ciclo celular (Hamanaka et al., *J. Biol. Chem.*, 270:21086-21091 (1995)). Esta familia de quinasas también funciona en la maduración del centrosoma (Lane et al., *J. Cell. Biol.*, 135:1701-1713 (1996)), la formación del huso bipolar (Golsteyn et al., *J. Cell. Biol.*, 129:1617-1628 (1995)), la adaptación de puntos de control de daños en el ADN (Arnaud et al., *Chromosoma*, 107:424-429 (1998)), y la regulación del complejo promotor de anafase (Kotani et al., *Mol. Cell.*, 1:371-380 (1998)).

PLK-1 fue el primer miembro de esta familia de quinasas en identificarse como equivalente de mamífero al gen *polo* de *Drosophila melanogaster*, necesario para pasar a través de mitosis (Golsteyn et al., *J. Cell. Sci.*, 107:1509-1517 (1994); Hamanaka et al., *Cell. Growth Differ.*, 5:249-257 (1994); Holtrich et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:1736-1740 (1994); Lake et al., *Mol. Cell. Biol.*, 13:7793-7801 (1993)). La expresión de PLK-1 demostró correlacionarse con la actividad mitótica de las células (Golsteyn et al., *J. Cell. Sci.*, 107:1509-1517 (1994); Lake et al., *Mol. Cell. Biol.*, 13:7793-7801 (1993)) y estar elevada en tumores de varios orígenes incluyendo pulmón, colon, estómago, músculo liso, y esófago (Holtrich et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91:1736-1740 (1994)). La sobreexpresión o expresión constitutiva de PLK-1 también ha demostrado inducir transformación maligna de células de mamífero (Mundt et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 239:377-385 (1997); Smith et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 234:397-405 (1997)). La microinyección de ARN antisentido de PLK-1 en células de fibroblasto de ratón NIH3T3 en crecimiento demostró bloquear la incorporación de timidina tritiada, lo que sugiere que la expresión de PLK-1 está restringida y es necesaria para las células en proliferación (Hamanaka et al., *Cell. Growth Differ.*, 5:249-257 (1994)).

Se encuentra soporte adicional para esta conclusión en estudios que muestran que niveles elevados de expresión de PLK-1 son indicadores pronóstico significativos de cáncer pulmonar no microcítico (Wolf et al., *Oncogene*, 14:543-549 (1997)), cáncer de mama y pulmón (Yuan et al., *Am. J. Pathol.*, 150:1165-1172 (1997)), carcinoma esofágico (Tokumitsu et al., *Int. J. Oncol.*, 15:687-692 (1999)), y carcinoma de células escamosas de la cabeza y el cuello (Knecht et al., *Cancer Res.*, 59:2794-2797 (1999)). La modulación farmacológica de la actividad, expresión, o función de PLK-1 puede, por lo tanto, ser un punto apropiado de intervención terapéutica en afecciones patológicas.

Actualmente, no se conocen agentes terapéuticos que inhiban la síntesis de PLK-1 y las estrategias de investigación dirigidas a la modulación de la función de PLK-1 han implicado el uso de anticuerpos y oligonucleótidos antisentido. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de PLK-1 usando oligonucleótidos antisentido provocó la pérdida de viabilidad celular en células A549 cultivadas y actividad antitumoral en xenoinjertos A549 de ratones desnudos (Elez et al., Biochem. Biophys. Res. Common., 209:352-356 (2000)). Asimismo, la patente de Estados Unidos N° 6.906.186 describe la inhibición de la expresión de PLK-1 usando oligonucleótidos antisentido en un sistema de cultivo celular *in vitro*. Sin embargo, estas estrategias están sin ensayar como protocolos terapéuticos y por consiguiente sigue existiendo una necesidad desde hace tiempo de agentes capaces de inhibir de forma eficaz la función PLK-1 *in vivo*. El documento US 2007/265438 y el documento CN 1651450 describen ARN interferentes pequeños (ARNip) que aborden PLK-1. El documento WO 2007/051303 describe moléculas ARNip modificadas y usos de las mismas. Judge et al. (2006) Mol. Ther., 13(3), 494-505 describe el diseño de un ARNip sintético no inflamatorio que medie el potente silenciamiento génico *in vivo*. Zimmerman et al. (2006) Nature, 441, 111-114 describe silenciamiento génico mediado por iARN en primates.

Por tanto, existe la necesidad de composiciones y métodos para modular específicamente la expresión de PLK-1. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula modificada de ARNip para silenciar la expresión de la quinasa 1 tipo polo (PLK-1), donde la molécula modificada de ARNip comprende una hebra con sentido que consiste en una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 400, una hebra antisentido complementaria, y una región bicatenaria de al menos 15 nucleótidos de longitud, y donde la hebra antisentido comprende uno o más nucleótidos modificados en la región bicatenaria seleccionados entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos. En este documento se describen partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero (por ejemplo, SNALP) que comprenden una molécula de ARN interferente descrita en este documento, un lípido catiónico, y un lípido no catiónico, que pueden comprender adicionalmente un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. Se describen adicionalmente en este documento métodos para silenciar la expresión del gen PLK-1 administrando una molécula de ARN interferente descrita en este documento a un sujeto mamífero. También se describen adicionalmente en este documento métodos para identificar y/o modificar ARN interferente de PLK-1 que tenga propiedades inmunoestimuladoras. También se describen en este documento los métodos para sensibilizar a una célula tal como una célula cancerosa a los efectos de un fármaco quimioterapéutico que comprende suministrar secuencialmente ARN interferente de PLK-1 seguido por el fármaco quimioterapéutico.

Un aspecto descrito en este documento proporciona una molécula modificada de ARNip que comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, ó 19-25 nucleótidos de longitud, o 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25 nucleótidos de longitud), donde la molécula modificada de ARNip es capaz de silenciar la expresión de PLK-1.

Típicamente, la molécula modificada de ARNip comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más nucleótidos modificados en la región bicatenaria. En algunas realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado comprende de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 100% (por ejemplo, aproximadamente el 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, ó 100%) de nucleótidos modificados en la región bicatenaria. En realizaciones preferidas, menos de aproximadamente el 25% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 25%, 20%, 15%, 10%, ó 5%) o de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 25% (por ejemplo, de aproximadamente el 1%-25%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-25%, ó 10%-20%) de los nucleótidos en la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados.

Se describen en este documento ARNip modificados que comprenden nucleótidos modificados incluyendo 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA), y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas descritas en este documento, el ARNip modificado comprende 2'OMe nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe purina y/o pirimidina) tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, nucleótidos de 2'OMe-citosina, y mezclas de los mismos. En ciertos casos, el ARNip modificado no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina. En otras realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado comprende una estructura de bucle en horquilla.

El ARNip modificado puede comprender nucleótidos modificados en una hebra (es decir, con sentido o antisentido) o ambas hebras de la región bicatenaria de la molécula de ARNip. Con respecto a las modificaciones de nucleótidos de uridina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los nucleótidos de uridina en la hebra con sentido y/o antisentido pueden ser un nucleótido modificado de uridina tal como un nucleótido de 2'OMe-uridina. En algunas realizaciones, cada nucleótido de uridina en la hebra con sentido y/o antisentido es un nucleótido de 2'OMe-uridina. Con respecto a modificaciones del nucleótido guanosina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los nucleótidos de guanosina en la hebra con sentido y/o antisentido pueden ser un nucleótido modificado de guanosina. En algunas realizaciones, cada nucleótido de guanosina en la hebra con sentido y/o antisentido es un nucleótido de

2'OMe-guanosina.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip es menos inmunoestimuladora que una secuencia correspondiente de ARNip no modificada. En ciertas realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado es al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% menos inmunoestimulador que la correspondiente secuencia de ARNip no modificada. En otras realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado es al menos aproximadamente un 70% (por ejemplo, un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%) menos inmunoestimulador que la correspondiente secuencia de ARNip no modificada. Será fácilmente evidente para los especialistas en la técnica que las propiedades inmunoestimuladoras de la molécula modificada de ARNip y la correspondiente molécula de ARNip no modificada pueden determinarse por, por ejemplo, medición de los niveles de INF- α y/o IL-6 aproximadamente dos a aproximadamente doce horas después de la administración sistémica en un mamífero o transfección de una célula respondedora de mamífero usando un sistema apropiado de suministro basado en lípidos (tal como el sistema de suministro SNALP u otros sistemas lipoplex descritos en este documento).

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip tiene una CI_{50} (es decir, concentración inhibitoria a la mitad del máximo) menor de o igual a diez veces la del correspondiente ARNip no modificado (es decir, el ARNip modificado tiene una CI_{50} que es menor de o igual a diez veces la CI_{50} del correspondiente ARNip no modificado). En otras realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado tiene una CI_{50} menor de o igual a tres veces la de la correspondiente secuencia de ARNip no modificada. En otras realizaciones más descritas en este documento, el ARNip modificado tiene una CI_{50} menor de o igual a dos veces la del correspondiente ARNip no modificado. Será muy evidente para los especialistas en la técnica que puede generarse una curva de respuesta a dosis y los valores de CI_{50} para el ARNip modificado y el correspondiente ARNip no modificado pueden determinarse fácilmente usando métodos conocidos para los especialistas en la técnica.

En otras realizaciones más descritas en este documento, el ARNip modificado es capaz de silenciar al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% de la expresión de la secuencia diana respecto a la correspondiente secuencia de ARNip no modificada.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado no comprende modificaciones en la estructura fosfato, por ejemplo, en la hebra con sentido y/o antisentido de la región bicatenaria. En otras realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado no comprende 2'-desoxi nucleótidos, por ejemplo, en la hebra con sentido y/o antisentido de la región bicatenaria. En ciertos casos, el nucleótido en el extremo 3' de la región bicatenaria en la hebra con sentido y/o antisentido no es un nucleótido modificado. En otros ciertos casos, los nucleótidos cerca del extremo 3' (por ejemplo, en uno, dos, tres o cuatro nucleótidos del extremo 3') de la región bicatenaria en la hebra con sentido y/o antisentido no son nucleótidos modificados.

Las moléculas modificadas de ARNip descritas en este documento pueden tener salientes 3' de uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos en uno o ambos lados de la región bicatenaria, o pueden carecer de salientes (es decir, tener extremos romos) en uno o ambos lados de la región bicatenaria. Preferiblemente, el ARNip modificado tiene salientes 3' de dos nucleótidos en cada lado de la región bicatenaria. En ciertos casos, el saliente 3' de la hebra antisentido tiene complementariedad con la secuencia diana y el saliente 3' de la hebra con sentido tiene complementariedad con la hebra complementaria de la secuencia diana. Como alternativa, los salientes 3' no tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En algunas realizaciones descritas en este documento, los salientes 3' comprenden uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos tales como 2'-desoxi (2'H) nucleótidos. En ciertas realizaciones preferidas descritas en este documento, los salientes 3' comprenden desoxitimidina (dT) y/o nucleótidos de uridina. En otras realizaciones descritas en este documento, uno o más de los nucleótidos en los salientes 3' en uno o ambos lados de la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados. Ejemplos no limitantes de nucleótidos modificados se han descrito anteriormente e incluyen 2'OMe nucleótidos, 2'-desoxi-2'F nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-2-MOE nucleótidos, nucleótidos LNA, y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas descritas en este documento, uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos en los salientes 3' presentes en las hebras con sentido y/o antisentido del ARNip comprenden 2'OMe nucleótidos (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe purina y/o pirimidina) tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, nucleótidos de 2'OMe-citosina, y mezclas de los mismos.

Las moléculas de ARNip descritas en este documento pueden comprender al menos una o un cóctel (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) de secuencias modificadas de ARNip que silencian la expresión de PLK-1. En ciertos casos, uno o más de los ARNip modificados descritos en este documento están presentes en un cóctel con una o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más) secuencias no modificadas de ARNip que silencian la expresión de PLK-1. En algunas realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende una versión modificada químicamente (por ejemplo, 2'OMe-modificada) de al menos una o un cóctel de las secuencias no modificadas expuestas en las Tablas 1-7. En otras realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende al

menos una o un cóctel de las secuencias modificadas expuestas en las Tablas 3, 6, y 10-11. Preferiblemente, la molécula modificada de ARNip se selecciona entre el grupo que consiste en PLK1424 2/6, PLK1424 U4/GU, PLK1424 U4/G, PLK773 G/GU, PLK1425 3/5, y una mezcla de las mismas.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la correspondiente secuencia de ARNip no modificada comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más motivos 5'-GU-3'. El motivo 5'-GU-3' puede estar en la hebra con sentido, la hebra antisentido, o ambas hebras de la secuencia no modificada de ARNip. Los motivos 5'-GU-3' pueden estar adyacentes entre sí o, como alternativa, pueden estar separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más nucleótidos.

En ciertas realizaciones, el ARNip modificado comprende adicionalmente un sistema de vehículo, por ejemplo, para suministrar el ARNip modificado a una célula de un mamífero. La presente invención proporciona un sistema de vehículo que comprende un ARNip modificado de la invención, opcionalmente donde el sistema de vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en una partícula de ácido nucleico-lípido, un liposoma, una micela, un virosoma, un complejo de ácido nucleico, y mezclas de los mismos, tales como donde el sistema de vehículo es una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: una molécula modificada de ARNip de la invención; un lípido catiónico; y un lípido no catiónico. En ciertos casos descritos en este documento, el ARNip modificado está en complejo con un polímero tal como un polímero catiónico (por ejemplo, polietilénimina (PEI)) para formar un poliplex. El ARNip modificado también puede estar en complejo con una ciclodextrina o un polímero de la misma. Preferiblemente, el ARNip modificado se encapsula en una partícula de ácido nucleico-lípido.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende:

- (i) una molécula modificada de ARNip de la invención; o
- (ii) una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto descrito en este documento proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido que aborda la expresión de PLK-1. La partícula de ácido nucleico-lípido comprende una molécula modificada de ARNip que silencia la expresión de PLK-1, un lípido catiónico, y un lípido no catiónico. En ciertos casos descritos en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. Preferiblemente, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende una molécula modificada de ARNip que silencia la expresión de PLK-1, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas.

El lípido catiónico puede ser, por ejemplo, 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), dioctadecildimetilamonio (DODMA), diestearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3 - (N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietyl amonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimeti-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 2,3-Dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina (DLinDAP), 1,2-N,N'-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLin-carbDAP), 1,2-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLinCDAP), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-XTC2-DMA), o mezclas de los mismos. Los lípidos catiónicos tales como CLinDMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20060240554. Los lípidos catiónicos tales como DLin-K-DMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/018.627, presentada el 2 de enero de 2008 (publicada como WO 2009/086558), la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/049.568, presentada el 1 de mayo de 2008 (publicada como WO 2009/086558), y la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/104.219, presentada el 9 de octubre de 2008 (publicada como WO 2010/042877). Los lípidos catiónicos tales como DLin-K-XTC2-DMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describen en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/104.212, presentada el 9 de octubre de 2008 (publicada como WO 2010/042877). El lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 2% en mol a aproximadamente el 60% en mol, de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 15% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 50% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 50% en mol, de aproximadamente el 40% en mol a aproximadamente el 50% en mol, o de aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula.

El lípido no catiónico puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro incluyendo, aunque sin limitación, distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoil oleil-fosfatidiletano lamina (POPE), palmitoiloleil-fosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-

fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol, o mezclas de los mismos. El lípido no catiónico puede comprender de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 90% en mol, de aproximadamente el 10% en mol a aproximadamente el 85% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 85% en mol, de aproximadamente el 10% en mol (por ejemplo, fosfolípido tal como DSPC o DPPC solamente), o de aproximadamente el 60% en mol (por ejemplo, aproximadamente el 10% en mol de un fosfolípido tal como DSPC o DPPC y aproximadamente el 48% en mol de colesterol) del lípido total presente en la partícula.

El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede ser un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, o un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido, un conjugado de polímero catiónico-lípido (CPL), o mezclas de los mismos. En una realización preferida, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido. En ciertas realizaciones descritas en este documento, el conjugado de PEG-lípido o conjugado de ATTA-lípido se usa junto con un CPL. El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas puede comprender un polietilenglicol-lípido, por ejemplo, un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG dialquilohipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, una PEG-ceramida (Cer), o mezclas de los mismos. El conjugado PEG-DAA puede ser PEG-dilaurilohipropilo (C12), un PEG-dimiristilohipropilo (C14), un PEG-dipalmitilohipropilo (C16), y un PEG-diesterilohipropilo (C18). Conjugados adicionales de PEG-lípido adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero sin limitación, PEG-C-DOMG, descrito en la solicitud provisional de Estados Unidos N° 61/039.748, presentada el 26 de marzo de 2008, y 1-[8'-(1,2-Dimiristiloil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil- ω -metil-poli(etilen glicol) (2KPEG-DMG), descrito en la patente de Estados Unidos N° 7.404.969. En algunas realizaciones descritas en este documento, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas es un CPL que tiene la fórmula: A-W-Y, donde A es un resto lipídico, W es polímero hidrófilo, e Y es resto policatiónico. W puede ser un polímero seleccionado entre el grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), poliamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, o combinaciones de los mismos, teniendo el polímero un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 7000 dalton. En algunas realizaciones descritas en este documento, Y tiene al menos 4 cargas positivas a un pH seleccionado. En algunas realizaciones descritas en este documento, Y puede ser lisina, arginina, asparagina, glutamina, derivados de los mismos, o combinaciones de los mismos. El lípido conjugado que evita la agregación de partículas puede ser del 0% en mol a aproximadamente el 20% en mol, de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 20% en mol, de aproximadamente el 1% en mol a aproximadamente el 15% en mol, de aproximadamente el 4% en mol a aproximadamente el 10% en mol, o de aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente colesterol o un derivado del mismo. Ejemplos de derivados adecuados de colesterol incluyen, aunque sin limitación, colestanol, colestanonona, colestanonona, coprostanol, colesteril-2'-hidroxietil éter, y colesteril-4'-hidroxibutil éter. El colesterol o derivado de colesterol puede ser del 0% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 2% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 10% en mol a aproximadamente el 60% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 50% en mol, o de aproximadamente el 48% en mol del lípido total presente en la partícula.

En una realización específica descrita en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende el 40% en mol de DLinDMA, el 10% en mol de DSPC, el 2% en mol de PEG-cDMS, y el 48% en mol de colesterol.

En otras realizaciones descritas en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) uno o más ARNip no modificados y/o modificados que silencian la expresión de PLK-1; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 85% en mol del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 13% en mol a aproximadamente el 49,5% en mol del lípido total presente en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula. En una realización preferida descrita en este documento, el ARNip está completamente encapsulado dentro del lípido de la partícula de ácido nucleico-lípido de modo que el ARNip en la partícula de ácido nucleico-lípido es resistente en solución acuosa a la degradación por una nucleasa. En una realización preferida descrita en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido es sustancialmente no tóxica para mamíferos.

En las realizaciones de SNALP descritas en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender uno o más de los lípidos catiónicos descritos anteriormente. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico es DLinDMA. El lípido catiónico típicamente comprende de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 85% en mol, de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 80% en mol, de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 75% en mol, de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 65% en mol, o de aproximadamente el 55% en mol a aproximadamente el 65% en mol del lípido total presente en la partícula.

El lípido no catiónico en las realizaciones de SNALP descritas en este documento puede ser un lípido aniónico o un lípido neutro. En una realización, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo. En esta

realización, el colesterol o derivado de colesterol comprende de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula. En otra realización descrita en este documento, el lípido no catiónico comprende un fosfolípido. En otra realización más, el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol.

Los fosfolípidos adecuados para su uso en las realizaciones de SNALP descritas en este documento incluyen, aunque sin limitación, DPPC, DSPC, DOPE, POPC, POPE, POPG, DPPE, DMPE, DSPE, monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, DEPE, SOPE, EPC, y una mezcla de los mismos. Cuando el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol, el fosfolípido comprende de aproximadamente el 4% en mol a aproximadamente el 10% en mol del lípido total presente en la partícula, y el colesterol o derivado de colesterol comprende de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula. Si se usa un derivado de colesterol, el derivado de colesterol incluye, aunque sin limitación, colestanol, colestano, colesteno, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, y colesteryl-4'-hidroxibutil éter. En una realización preferida descrita en este documento, el fosfolípido comprende DPPC.

Los SNALP de las realizaciones descritas en este documento también comprenden un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas. Ejemplos de lípidos conjugados adecuados incluyen, aunque sin limitación, un conjugado de PEG-lípido, un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido, un conjugado de polímero catiónico-lípido (CPL), o mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido. En ciertas realizaciones descritas en este documento, el conjugado de PEG-lípido o el conjugado de ATTA-lípido se usa junto con un CPL. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido conjugado es un PEG-lípido.

Ejemplos de PEG-lípidos adecuados incluyen, aunque sin limitación, un PEG-DAG, un PEG-DAA, un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el PEG-lípido es un conjugado de PEG-DAA. Ejemplos de conjugados PEG-DAA adecuados incluyen, aunque sin limitación, un PEG-dilauriloxipropilo (C12), un PEG-dimiristiloxipropilo (C14), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C16), y un PEG-disteariloxipropilo (C18). En una realización preferida, el conjugado de PEG-DAA es PEG-dimiristiloxipropilo (C 14). En otra realización preferida descrita en este documento, el conjugado de PEG-DAA es PEG-disteariloxipropilo (C18). Conjugados adicionales de PEG-lípido incluyen, aunque sin limitación, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, y una mezcla de los mismos. El conjugado lípido típicamente comprende de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

Típicamente, los SNALP de las realizaciones descritas en este documento tienen una proporción de lípido:ácido nucleico de aproximadamente 1 a aproximadamente 100. En una realización preferida descrita en este documento, estos SNALP tienen una proporción de lípido:ácido nucleico de aproximadamente 5 a aproximadamente 15. En otra realización preferida descrita en este documento, estos SNALP tienen una proporción lípido:ácido nucleico de aproximadamente 6. Típicamente, estos SNALP tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm. En una realización preferida descrita en este documento, estos SNALP tienen un diámetro medio de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm.

En una realización específica descrita en este documento, el SNALP comprende: (a) uno o más ARNip no modificados y/o modificados que silencian la expresión de PLK-1; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 56,5% en mol a aproximadamente el 66,5% en mol del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 31,5% en mol a aproximadamente el 42,5% en mol del lípido total presente en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula. Esta realización descrita en este documento de SNALP se menciona generalmente en este documento como la formulación "1:62". En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico es DLinDMA, el lípido no catiónico es colesterol y el lípido conjugado es un conjugado de PEG-DAA. Aunque estas son realizaciones preferidas de la formulación 1:62, los especialistas en la técnica apreciarán que pueden usarse otros lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos, incluyendo otros derivados de colesterol, y lípidos conjugados en la formulación 1:62 descrita en este documento.

En otra realización específica descrita en este documento, el SNALP comprende: (a) uno o más ARNip no modificados y/o modificados que silencian la expresión de PLK-1; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 52% en mol a aproximadamente el 62% en mol del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 36% en mol a aproximadamente el 47% en mol del lípido total presente en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula. Esta realización de SNALP se menciona generalmente en este documento como la formulación "1:57". En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico es DLinDMA, el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido (tal como DPPC) y colesterol, donde el fosfolípido comprende aproximadamente del 5% en mol a aproximadamente el 9% en mol del lípido total presente en la partícula, y el colesterol (o derivado de colesterol) comprende de aproximadamente el 32% en mol a aproximadamente el 37% en mol del lípido total presente en la partícula, y el PEG-lípido es PEG-DAA. Aunque estas son realizaciones preferidas de la formulación 1:57, los

especialistas en la técnica apreciarán que pueden usarse otros lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos (incluyendo otros fosfolípidos y otros derivados de colesterol) y lípidos conjugados en la formulación 1:57 descrita en este documento.

En algunas realizaciones descritas en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más moléculas no modificadas o modificadas de ARNip que comprenden o consisten en las secuencias expuestas en las Tablas 1-7 y 10-11. En otras realizaciones descritas en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden moléculas modificadas de ARNip seleccionadas entre el grupo que consiste en PLK1424 U4/GU, PLK1424 U4/G, PLK773 G/GU, PLK1425 3/5, y mezclas de las mismas.

Las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento son útiles para el suministro terapéutico de moléculas de ARNip que silencian la expresión de PLK-1. En una realización, una molécula modificada de ARNip descrita en este documento se formula en partículas de ácido nucleico-lípido, y las partículas se administran a un mamífero (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o un primate tal como un ser humano, chimpancé, o mono) que requiere dicho tratamiento. En ciertos casos descritos en este documento, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula de ácido nucleico-lípido al mamífero, por ejemplo, para tratar un cáncer tal como carcinoma hepatocelular (HCC). La administración de la partícula de ácido nucleico-lípido puede ser por cualquier vía conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, o intradérmica.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la molécula de ARNip en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de exposición de la partícula a una nucleasa a 37°C durante al menos 20, 30, 45 ó 60 minutos, o después de incubación de la partícula en suero a 37°C durante al menos 30, 45 ó 60 minutos o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, o 36 horas.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la molécula de ARNip está completamente encapsulada en la partícula de ácido nucleico-lípido. En otras realizaciones descritas en este documento, la molécula de ARNip está en complejo con la parte lipídica de la partícula.

En otro aspecto más descrito en este documento, las moléculas de ARNip descritas en este documento se usan en métodos para silenciar la expresión de PLK-1. En particular, un objeto de la presente descripción es proporcionar métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero regulando negativamente o silenciando la transcripción y/o traducción de un gen PLK-1. En una realización, la presente invención proporciona un método *in vitro* para introducir un ARNip que silencie la expresión de la quinasa 1 tipo polo (PLK-1) en una célula, comprendiendo el método: poner en contacto la célula con una molécula modificada de ARNip de la invención, o una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico. En otra realización, la presente invención proporciona una molécula modificada de ARNip de la invención o una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico, para su uso en un método para el suministro *in vivo* de un ARNip que silencie la expresión de la quinasa 1 tipo polo (PLK-1), comprendiendo dicho método administrar dicha molécula de ARNip o dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un sujeto mamífero *in vivo*. La administración de la molécula de ARNip puede ser por cualquier vía conocida en la técnica, tal como, por ejemplo, oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, o intradérmica.

En estas realizaciones, la molécula de ARNip que silencia la expresión de PLK-1 se formula típicamente con un sistema de vehículo, y el sistema de vehículo que comprende la molécula de ARNip se administra a un mamífero que requiere dicho tratamiento. Como alternativa, se retiran células de un mamífero tal como un ser humano, se suministra el ARNip *in vitro* usando un sistema de vehículo, y las células después se administran al mamífero, tal como por inyección. Ejemplos de sistemas de vehículo adecuados para su uso como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación, partículas de ácido nucleico-lípido, liposomas, micelas, virosomas, complejos de ácido nucleico (por ejemplo, lipoplexes, poliplexes, etc.), y mezclas de los mismos. El sistema de vehículo puede comprender al menos una o un cóctel (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más) de moléculas de ARNip que silencian la expresión de PLK-1. En ciertas realizaciones descritas en este documento, el sistema de vehículo comprende al menos una o un cóctel de las secuencias expuestas en las Tablas 1-7 y 10-11.

En algunas realizaciones, la molécula de ARNip que silencia la expresión de PLK-1 está en una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende la molécula de ARNip, un lípido catiónico, y un lípido no catiónico. Preferiblemente, la molécula de ARNip está en una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende la molécula de ARNip, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula de ácido nucleico-lípido a un mamífero (por ejemplo, un roedor tal como un ratón o un primate tal como un ser humano, chimpancé, o mono).

En algunas realizaciones descritas en este documento, el mamífero tiene un trastorno proliferativo celular. En ciertos aspectos de esta realización descrita en este documento, el mamífero tiene un trastorno proliferativo celular seleccionado entre el grupo que consiste en neoplasia (por ejemplo, cáncer), hiperplasia, reestenosis, hipertrofia

cardíaca, trastornos inmunes, e inflamación. Preferiblemente, el trastorno proliferativo celular es un trastorno neoplásico tal como cáncer. En algunas realizaciones descritas en este documento, el cáncer incluye, aunque sin limitación, carcinoma hepatocelular (HCC), papiloma, blastoglioma, sarcoma de Kaposi, melanoma, cáncer pulmonar, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, astrocitoma, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer pulmonar, cáncer colorrectal, cáncer de tiroides, cáncer pancreático, cáncer gástrico, leucemia, linfoma, enfermedad de Hodgkin, osteosarcoma, cáncer testicular, y enfermedad de Burkitt.

En una realización descrita en este documento, al menos aproximadamente el 1%, 2%, 4%, 6%, 8%, 10%, 12%, 14%, 16%, 18%, o el 20% de la dosis total inyectada de las partículas de ácido nucleico-lípido está presente en plasma a aproximadamente 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 18, ó 24 horas después de la inyección. En otras realizaciones descritas en este documento, más de aproximadamente el 20%, 30%, 40%, o tanto como aproximadamente el 60%, 70%, u 80% de la dosis total inyectada de las partículas de ácido nucleico-lípido está presente en plasma a aproximadamente 1, 4, 6, 8, 10, 12, 20, ó 24 horas después de la inyección. En otra realización descrita en este documento, el efecto de la molécula de ARNip (por ejemplo, regulación negativa de la secuencia diana de PLK-1) en un sitio proximal o distal al sitio de administración es detectable a aproximadamente 12, 24, 48, 72, ó 96 horas, o a aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, ó 28 días después de la administración de las partículas de ácido nucleico-lípido. En una realización adicional, la regulación negativa de la expresión de la secuencia diana de PLK-1 es detectable a aproximadamente 12, 24, 48, 72, ó 96 horas, o a aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, ó 28 días después de la administración. En algunas realizaciones descritas en este documento, la regulación negativa de un gen PLK-1 se determina detectando los niveles de ARNm o de proteína en una muestra biológica del mamífero. En otras realizaciones descritas en este documento, la regulación negativa de la expresión de una secuencia de PLK-1 se detecta midiendo la viabilidad celular o la inducción de apoptosis de células en una muestra biológica del mamífero.

Las partículas de ácido nucleico-lípido son adecuadas para su uso en suministro intravenoso de ácido nucleico ya que son estables en circulación, de un tamaño necesario para comportamiento farmacodinámico que provoca el acceso a sitios extravasculares, y poblaciones de células diana. También se describen en este documento composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden partículas de ácido nucleico-lípido.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ARNip modificado de la invención, o un sistema de vehículo de acuerdo con la invención, para su uso en un método *in vivo* para sensibilizar una célula cancerosa a los efectos de un fármaco quimioterapéutico, comprendiendo el método:

poner en contacto la célula cancerosa con dicha molécula de ARNip antes de administrar el fármaco quimioterapéutico; opcionalmente donde:

(a) la célula cancerosa está en un mamífero; o

(b) el fármaco quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en paclitaxel, fluorouracilo (5-FU), irinotecano, sorafenib, y mezclas de los mismos. En particular, se describen en este documento ARNip modificados o sistemas de vehículo de la invención para su uso en métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de un trastorno proliferativo celular en un mamífero regulando negativamente o silenciando la transcripción y/o traducción de un gen PLK-1 en combinación con administración de un fármaco quimioterapéutico. Como se describe en detalle en este documento, puede tratarse un mamífero tal como un ser humano con una dosis adecuada de una o más moléculas no modificadas o modificadas de ARNip (por ejemplo, formuladas en partículas de ácido nucleico-lípido) antes, durante, y/o después de la administración del fármaco quimioterapéutico. En realizaciones preferidas descritas en este documento, se pone en contacto una célula tal como una célula cancerosa en un mamífero tal como un ser humano con un ARNip que silencie la expresión de PLK-1 antes de administrar el fármaco quimioterapéutico.

Un aspecto adicional descrito en este documento proporciona composiciones que comprenden las moléculas de ARN interferente asimétrico (ARNia) descritas en este documento que abordan la expresión de PLK-1 y métodos para usar dichas composiciones para silenciar la expresión de PLK-1.

Un aspecto relacionado descrito en este documento proporciona composiciones que comprenden las moléculas de microARN (miARN) descritas en este documento para abordar la expresión de PLK-1 y métodos para usar dichas composiciones para silenciar la expresión de PLK-1.

Otros objetos, características, y ventajas de la presente invención serán evidentes para los especialistas en la técnica a partir de la siguiente descripción detallada y las figuras.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra datos que demuestran la actividad iARN de secuencias seleccionadas de ARNip para PLK-1 formuladas en SNALP en células HT29 y Neuro2A.

La Figura 2 ilustra datos que demuestran que los potentes efectos de SNALP para PLK-1 sobre la viabilidad

celular se deben al silenciamiento del ARNm de PLK-1.

La Figura 3 ilustra datos que demuestran la actividad iARN de secuencias adicionales de ARNip para PLK-1 formuladas en SNALP en células HT29 y Neuro2A.

La Figura 4 ilustra datos que demuestran la actividad de PLK1424 y PLK773 formulados en SNALP en células HT29 y LS 174T.

La Figura 5 ilustra datos que demuestran que PLK1424 y PLK773 formulados en SNALP inducen apoptosis en células LS174T.

La Figura 6 ilustra datos que demuestran la actividad iARN de secuencias adicionales de ARNip para PLK-1 formuladas en SNALP en células HT29 y Neuro2A.

La Figura 7 ilustra datos que demuestran que diferentes patrones de modificación 2'OMe en la secuencia de ARNip PLK1424 estaban bien tolerados y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad.

La Figura 8 ilustra datos que demuestran que ARNip PLK1424 2'OMe modificados inducían respuesta no detectable IL-6 o IFN- α en cultivos murinos FLT3L DC.

La Figura 9 ilustra datos que demuestran que diferentes patrones de modificación 2'OMe en la secuencia de ARNip PLK773 estaban bien tolerados y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad.

La Figura 10 ilustra datos que demuestran que diferentes patrones de modificación 2'OMe en la secuencia de ARNip PLK1425 estaban bien tolerados y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad.

La Figura 11 ilustra datos que demuestran que el tratamiento secuencial de combinación con SNALP para PLK-1 y paclitaxel (taxol) potenciaba significativamente la inhibición del crecimiento de células Neuro2A y HepG2.

La Figura 12 ilustra datos que demuestran que el tratamiento secuencial de combinación con SNALP para PLK-1 y paclitaxel (taxol) potenciaba significativamente el nivel de apoptosis inducido en células Neuro2A.

La Figura 13 ilustra datos que demuestran que un régimen de tratamiento de PLK1424 formulado en SNALP es bien tolerado sin signos aparentes de toxicidad relacionada con el tratamiento en ratones que albergan tumores hepáticos Hep3B.

La Figura 14 ilustra datos que demuestran que el tratamiento con PLK1424 formulado en SNALP causaba un aumento significativo en la supervivencia de ratones que albergan tumor Hep3B.

La Figura 15 ilustra datos que demuestran que el tratamiento con PLK1424 formulado en SNALP reducía los niveles de ARNm de PLK-1 en un 50% en tumores intrahepáticos Hep3B que crecen en ratones 24 horas después de la administración de SNALP.

La Figura 16 ilustra datos que demuestran que un producto de escisión específica de ARNm de PLK-1 era detectable en ratones tratados con SNALP PLK1424 por 5' RACE-PCR. Se cargaron 10 μ l de producto de PCR/pocillo en un gel de agarosa al 1,5%. N^{os} de carril: (1) marcador de peso molecular (PM); (2) PBS ratón 1; (3) PBS ratón 2; (4) PBS ratón 3; (5) SNALP Luc ratón 1; (6) SNALP Luc ratón 2; (7) SNALP PLK ratón 1; (8) SNALP PLK ratón 2; (9) SNALP PLK ratón 3; y (10) control sin molde.

La Figura 17 ilustra datos que demuestran que ratones tratados con SNALP de control (Luc) presentaban mitosis normales en tumores Hep3B (paneles superiores), mientras que ratones tratados con SNALP PLK1424 mostraban numerosas mitosis aberrantes y apoptosis de células tumorales en tumores Hep3B (paneles inferiores).

La Figura 18 ilustra datos que demuestran que múltiples dosis de SNALP PLK-1 1:57 que contenía PEG-cDSA inducían la regresión de tumores subcutáneos (S.C.) Hep3B establecidos.

La Figura 19 ilustra datos que demuestran el silenciamiento del ARNm de SNALP PLK 1:57 en tumores Hep3B S.C. después de una única administración intravenosa de SNALP.

La Figura 20 ilustra datos que demuestran que SNALP PLK1-cDSA inhibía el crecimiento de tumores Hep3B S.C. grandes.

La Figura 21 ilustra datos que demuestran el silenciamiento de ARNm de PLK-1 derivado de tumor en tumores intrahepáticos Hep3B.

La Figura 22 ilustra datos que demuestran el perfil de eliminación en sangre de SNALP PLK-1 1:57 que contenía PEG-cDMA o PEG-cDSA.

La Figura 23 ilustra datos que demuestran una exploración de actividad *in vitro* de secuencias de ARNip para PLK-1. Se evaluó la actividad de secuencias de ARNip para PLK-1 nativo que abordan ARNm de PLK-1 humano en el ensayo de viabilidad en células HT29. Las células se trataron con PLK-1 formulado en SNALP o ARNip Luc a 1 nM (barra blanca), 5 nM (barra gris), y 25 nM (barra negra). La viabilidad celular se evaluó a las 72 horas usando colorante de resazurina CellTiter Blue. Se realizaron dos rondas de diseño de ARNip (A y B, C). Los números de secuencia representan el sitio diana de ARNip en la fase de lectura abierta del ARNm de hPLK-1 (Número de Acceso a GenBank NM_005030).

La Figura 24 ilustra datos que demuestran la actividad de ARNip para PLK-1 *in vitro*. Correlación entre el silenciamiento del ARNm y la viabilidad de células HT29 para tratamientos con (A) PLK1424, (B) PLK773, o (C) ARNip Luc. Se determinó el ARNm de PLK-1 por análisis de ADN_b a las 24 h. Se evaluaron placas duplicadas para la viabilidad celular a las 72 h. (D) el ARNip PLK1424 causa reducciones dependientes de la dosis en la viabilidad de cultivos celulares LS 174T, HT29, Hep3B, y HepG2. Las células se trataron durante 72 h con SNALP PLK1424 a ARNip 5 (barra negra), 2,5, 1,25, 0,63, y 0,31 (barra blanca) nM. Los valores en (A)-(D) se expresan como % de viabilidad o ARNm de PLK-1 respecto al control de PBS y reflejan la media de 3 experimentos diferentes (+/- DT) realizados en cultivos triplicados. (E) La viabilidad celular disminuida está asociada con la inducción de apoptosis. La actividad Caspasa 3/7 en células LS 174T se evaluó 24 h y 48 h después del tratamiento con PLK773, PLK1424, o

ARNip de control Luc encapsulado en SNALP. Los datos representan la inducción factorial sobre PBS en cultivos triplicados (media +/- DT de cultivos triplicados).

La Figura 25 ilustra datos que demuestran la caracterización *in vivo* de la respuesta de interferón inducida por ARNip formulado en SNALP. (a) Curso de tiempo para la inducción de IFN α en suero y ARN IFIT1 hepático después de administración i.v. de ARNip para ApoB1 nativo (no modificado) formulado en SNALP. Se administró a ratones Balb/c (n = 4 por grupo) 2,5 mg/kg de ARNip o vehículo lipídico; se evaluó el IFN α en suero (pg/ml) y el ARNm de IFIT1 (respecto a GAPDH) a partir de lisados hepáticos completos después de 4, 8, y 16 h por ELISA y ensayo de ADNb, respectivamente. (b,c) La medición de la inducción de ARNm de IFIT1 en tejidos diana puede resolver la actividad inmunoestimuladora residual dentro de ARNip. Los ratones se trataron con ARNip ApoB-1 nativo o ARNip ApoB-1 que contenían 2'OMe nucleótidos selectivos en la hebra con sentido (S) o en ambas hebras (S+AS). Se evaluó (b) el IFN α en suero y (c) al ARNm de IFIT1 hepático 4 h después de la administración (media + DT, n = 4). La actividad inmunoestimuladora residual en ausencia de inducción de citoquinas sistémicas fue evidente por inducción de ARNm de IFIT1 en ratones tratados con ApoB-1 2'OMe(S). Esta respuesta se anuló completamente mediante la incorporación de 2'OMe nucleótidos adicionales en la hebra AS del dúplex ARNip. Todos los ARNip retuvieron actividad iARN completa

La Figura 26 ilustra datos que demuestran la actividad *in vitro* de ARNip para PLK-1 y KSP no modificado frente a 2'OMe modificado. Actividad de los paneles 2'OMe modificados de ARNip (A) PLK1424 y (B) PLK773. Los ARNip no modificados PLK1424 o PLK773 (negro) se compararon en el ensayo de viabilidad celular Hep3B con los dúplex 2'OMe modificados 1/A, 2/A, 1/B, 2/B, 1/C, o 2/C que comprenden los respectivos oligonucleótidos 2'OMe con sentido/antisentido (véase, Tabla 6). Los datos son la viabilidad media de cultivos triplicados respecto a células tratadas con PBS y representativos dos experimentos independientes usando ARNip formulado en SNALP. (C) Inducción de citoquinas por ARNip para PLK-1 no modificado y 2'OMe *in vitro*. Se trataron DC Flt3L murinas con 5 μ g/ml de dúplex de ARNip PLK773 o PLK1424 no modificados (773, 1424) y sus oligonucleótidos constituyentes con sentido (S) o antisentido (AS) o los dúplex de ARNip 2'OMe PLK773-1/B y PLK1424-2/A formulados en SNALP. Se ensayaron IFN α e IL-6 en sobrenadantes de cultivo a las 24 h. Los valores son la media + SD de 3 experimentos diferentes realizados en cultivos triplicados. (D,E) Actividad de ARNip para KSP2263 formulado en SNALP en células Neuro2a murinas. (D) Correlación entre el silenciamiento del ARNm de KSP y la viabilidad celular respecto al control de PBS. Se determinó el ARNm de KSP por análisis de ADNb a las 24 h. Se evaluaron placas duplicadas para la viabilidad celular a las 72 h. (E) Exploración de actividad que compara el ARNip para KSP2263 no modificado con el panel de dúplex 2'OMe modificado (véase, Tabla 6) en el ensayo de viabilidad de células Neuro2a. Los datos representan la media +/- DT de cultivos triplicados, respecto al tratamiento con PBS.

La Figura 27 ilustra datos que demuestran la detección de los productos de escisión de ARNm específicos de PLK1424 y específicos de KSP2263 y por 5'RACE-PCR *in vitro*. (A) Se trataron células HT29 con PLK1424 formulado en SNALP 10 nM, ARNip Luc o PBS. Se aisló el ARN 24 horas después de la transfección y se ensayó para el producto de escisión de ARNm de PLK-1 específico por 5'-RACE-PCR. (B) Se trataron células Neuro2a con KSP2263 formulado en SNALP, ARNip PLK773 o PBS. Se aisló el ARN 24 horas después de la transfección y se ensayó para el producto de escisión de ARNm de KSP de ratón específico por 5'-RACE-PCR. La identidad de los productos de escisión específicos de iARN del ARNm de PLK-1 de 476pb y de ARNm de KSP de 102bp se confirmó por secuenciación directa de oligonucleótidos.

La Figura 28 ilustra datos que demuestran que ARNip para PLK-1, KSP, o Luc 2'OMe modificado no induce respuesta IFN medible en ratones. Se administraron ARNip Luc formulado en SNALP (no modificado) y 2'OMe modificado Luc-U/U, PLK1424-2/A, PLK773-1/B, o KSP2263-U/U a 2 mg/kg i.v. a ratones Balb/C. (A) Se evaluó ARNm de IFIT1 respecto a GAPDH en hígado y bazo a las 4 h por análisis de ADNb. (B). Se evaluó el IFN α en suero a las 6 h por ELISA. Los ARNip 2'OMe formulados en SNALP no indujeron aumento detectable en proteína IFN α o ARNm de IFIT1 respecto al vehículo PBS. Los valores representan la media + DT (n = 4).

La Figura 29 ilustra datos que demuestran la actividad terapéutica de ARNip para PLK-1 y KSP en tumores hepáticos. El tratamiento con PLK1424-2/A confiere ventajas significativas de supervivencia en ratones scid/beige que albergan tumores Hep3B hepáticos. Se administró a los ratones PLK1424-2/A (n = 15) o Luc-U/U (n = 8) formulado en SNALP a 6 x 2 mg/kg, de forma intravenosa dos veces a la semana (d 10 a d 28). (A) Pesos corporales (media + DT) sobre el periodo de dosificación expresados como % de peso inicial en el d 10. (B) Diagrama de Kaplan-Meier de días hasta eutanasia debido a carga tumoral. El tratamiento con PLK1424-2/A proporcionó ventaja significativa de supervivencia sobre el tratamiento de control. (p = 0,03, ensayo de Mantel Cox de rango Log). (C) Carga tumoral Hep3B hepática residual en ratones 24 h después de la administración de ARNip PLK1424-2/A (5 x 2 mg/kg de ARNip en d 8, 11, 14, 18 y 21). Las barras representan ARNm de hGAPDH / mg de hígado de ratones individuales (media +/- DT de análisis triplicados) determinado por ensayo de ADNb específico humano (Sin tumor = hígados de ratones no sembrados con tumor). Véase la Figura 32 para datos adicionales. (D) El tratamiento con KSP2263-U/U confiere ventajas de supervivencia en ratones A/J que albergan tumores Neuro2a hepáticos. Se administró a los ratones KSP2263-U/U o Luc-U/U (n = 8) formulado en SNALP a 5 x 4 mg/kg, de forma intravenosa (q3d x5 de d 8 a d 21 después de siembra del tumor). El diagrama de Kaplan-Meier de días hasta eutanasia debido a la carga tumoral y los criterios de valoración se basan en valores clínicos como un equivalente

humano para supervivencia. El tamaño de partícula medio de SNALP y (polidispersión) fueron 83 (0,09), y 90 (0,12) nm para las formulaciones PLK1424 y Luc, respectivamente.

La Figura 30 ilustra datos que demuestran que SNALP PLK1424 confiere ventajas significativas de supervivencia en el modelo de ratón Hep3B - nu/nu hepático. Los ratones que albergan tumores hepáticos establecidos se trataron con SNALP PLK1424-2/A o Luc-U/U (2 mg/kg dos veces a la semana entre d11 y d28 después de la siembra del tumor) y se controlaron para la carga tumoral hasta eutanasia definida por criterios de valoración humanos. Los datos representan 2 estudios independientes. Supervivencia media de PLK1424 frente a Luc en el estudio (A) = d 45 y d 67, respectivamente; $p = 0,02$, y estudio (B) = d 42 e indefinido, respectivamente, $p = 0,008$, ensayo de Mantel Cox de rango Log. Se descubrió que todos los animales que sobrevivieron más allá del día 80 estaban libres de tumor al finalizar el estudio en el día 100.

La Figura 31 ilustra datos que demuestran que SNALP PLK1424-2/A reduce significativamente la carga tumoral macroscópica después de completarse la dosificación. Los resultados son de ratones individuales descritos en la Figura 37C. Hígados de (A) ratones tratados con PBS de control y (B) SNALP PLK1424-2/A que muestran carga tumoral macroscópica en el lóbulo hepático lateral izquierdo. (C) Pesos corporales de ratones individuales mostrados en (A) y (B) sobre la duración del estudio desde el día 8 - día 21 después de siembra del tumor. La pérdida de peso corporal se correlacionaba directamente con la carga tumoral en ratones individuales.

La Figura 32 ilustra datos que demuestran que SNALP de PLK-1 se toleraba bien en ratones. Se administró a grupos de ratones CD1 ICR PBS SNALP, PLK773-1/B, o Luc-U/U para evaluar las toxicidades cumulativas potenciales asociadas con el silenciamiento de PLK-1 o el vehículo lipídico. Los ratones se trataron dos veces a la semana a 2 mg/kg de ARNip, equivalente al régimen de dosificación eficaz en estudios de tumor. Se evaluó la química clínica y los recuentos sanguíneos completos 24 h después de la dosis 5 (día 15) y la dosis 9 (día 29). El tratamiento con ARNip no indujo cambios significativos en (A) las enzimas hepáticas en suero alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), o sorbitol deshidrogenasa (SDH); (B) Wbc total, recuentos de linfocitos o neutrófilos y (C) recuentos de plaquetas a los 15 ó 29 días de duración del tratamiento. Todos los valores son media $\pm$ DT ($n = 6$). No se observaron cambios en los parámetros de glóbulos rojos.

La Figura 33 ilustra datos que demuestran el silenciamiento de ARNm diana en tumores hepáticos por el mecanismo de iARN. (A,B) Silenciamiento de ARNm diana y (C,D) detección de productos de escisión de ARNm específicos de iARN en tumores después de administración de ARNip formulado en SNALP. Se administró a ratones Scid/beige con tumores Hep3B intrahepáticos establecidos una única dosis de 2 mg/kg de ARNip PLK1424-2/A o Luc-U/U formulado en SNALP y se evaluó la actividad iARN por (A) ARNm de PLK-1 en lisados tumorales y (C) análisis de 5' RACE-PCR. (A) Proporciones de ARNm de PLK-1 (humano) tumoral:GAPDH 24 h después de la administración de ARNip (Media $\pm$ DT de 4 animales). (C) RACE-PCR detecta el producto de escisión 5' específico de ARNm de PLK-1 de tumores analizados en (A). Los carriles representan productos de PCR derivados de ratones individuales tratados con PBS ($n = 2$), Luc-U/U ($n = 2$), y PLK1424-2/A ($n = 3$). (B) ARNm de KSP de ratón y (D) análisis de 5'RACE-PCR de tumores Neuro2a hepáticos resecados de ratones tratados con ARNip KSP2263-U/U formulado en SNALP. Los datos se presentan como en (A) y (C). + = control positivo de lisados celulares Neuro2a *in vitro* tratados con ARNip KSP2263-U/U; - = control sin molde. La RACE-PCR detecta el producto de escisión 5' específico de ARNm de KSP de ratón de tumores. Las identidades de los productos de PCR predichos de PLK-1 de 476 pb y de KSP de 102 pb (flechas) se confirmaron por secuenciación directa de ADN. El tamaño medio de partícula de SNALP y (polidispersión) fue 83 (0,09), 90 (0,12), y 88 (0,07) nm para las formulaciones PLK1424, Luc, y KSP2263, respectivamente.

La Figura 34 ilustra datos que demuestran la duración de la actividad iARN dentro de tumores hepáticos. (A) Análisis de 5'-RACE-PCR de tumores hepáticos Hep3B 24 h, 48 h, 96 h, 7 d, y 10 d después de una única administración intravenosa de ARNip PLK1424-2/A formulado en SNALP (2 mg/kg). La especificidad del producto de RACE-PCR específico de PLK1424 (marcado con flecha) se confirmó por secuenciación en el d 1 y d 7, (B) Niveles correspondientes de ARNm de PLK-1 en ARN tumoral aislado analizado en (A). Duración de iARN correlacionado con la duración del silenciamiento de ARNm en comparación con ratones tratados con SNALP Luc-U/U. Los datos representan la proporción media de ARNm de hPLK-1:hGAPDH $\pm$ DT ($n = 3$ en cada momento puntual). El tamaño medio de partícula SNALP y (polidispersión) fue 83 (0,09) y 90 (0,12) nm para PLK1424 y Luc, respectivamente.

La Figura 35 ilustra datos que demuestran la inducción de formación de huso monoastal por ARNip KSP2263. Se trataron células HeLa durante 16 h con (A) ARNip Luc o (B) ARNip KSP2263 a 20 nM después se inmunotifieron para α -tubulina (FITC). El ADN se tiñó con DAPI y se capturaron y superpusieron imágenes fluorescentes. Las células de control muestran husos bipolares normales en metafase en comparación con husos monoastales en células tratadas con KSP2263.

La Figura 36 ilustra datos que demuestran que KSP2263-U/U induce distintos cambios fenotípicos típicos de inhibición de KSP en células tumorales hepáticas. Histología del tumor Neuro2a hepático 24 h después de una única administración intravenosa de (A) ARNip Luc-U/U o (B) ARNip KSP2263-U/U formulado en SNALP (2 mg/kg de ARNip). Las imágenes son a aumento 200x y representativas de tumores de al menos 6 ratones individuales. La tinción con Hematoxilina y eosina (HyE) revela células tumorales con figuras nucleares aberrantes típicas de husos

monoastrales o fenotipos apoptóticos en ratones tratados con KSP2263-U/U. (C) Histología cuantitativa de tejidos tumorales teñidos con HyE de ratones tratados con KSP2263-U/U formulado en SNALP a 4, 2, 1, ó 0,5 mg/kg de ARNip. Las células tumorales con estructuras de cromatina condensada se valoraron positivas y se calcularon como un % de las células tumorales totales captadas de 10 campos de visión. Las células positivas incluían figuras mitóticas y apoptóticas aberrantes y típicas. Los valores son la media + DT de 3 ratones. El tamaño medio de partícula SNALP y (polidispersión) fue 88 (0,07) y 82 (0,08) nm para KSP2263 y Luc, respectivamente.

La Figura 37 ilustra datos que demuestran que PLK1424-2A induce distintos cambios fenotípicos típicos de inhibición de PLK-1 en células tumorales hepáticas. Histología tumoral HyE 24 h después de una única administración intravenosa de 2 mg/kg de (A,C) ARNip Luc-U/U o (B,D) ARNip PLK1424-2/A formulado en SNALP. Imágenes a (A,B) 200x de aumento y (C,D) 400x de aumento son representativas de tumores de al menos 7 ratones individuales. El tamaño medio de partícula SNALP y (polidispersión) fue 72 (0,04) y 72 (0,02) nm para PLK1424 y Luc, respectivamente.

La Figura 38 ilustra datos que demuestran una comparación de SNALP PLK1424 que comprende PEG-cDMA o PEG-cDSA en el modelo de tumor hepático. (A) Eliminación de la sangre de SNALP marcado con ^3H (de acuerdo con Judge et al., Mol. Ther., 13:328-337 (2006)) que comprende PEG-cDMA o PEG-cDSA después de administración i.v. en ratones. Los datos se expresan como media del % de dosis inyectada (+/- DT, n = 4) que queda en sangre completa a las 0,25, 0,5, 1, 2, 4, y 8 h después de la inyección. (B) Silenciamiento de ARNm de PLK-1 en tumores Hep3B hepáticos 24 h después de una única administración de 2 mg/kg de formulaciones de SNALP PLK1424-2/A (proporción media de PLK1:GAPDH +/- DT, n = 4 ratones). (C) Tratamiento con SNALP PLK1424-2/A que comprende PEG-cDMA o PEG-cDSA confiere ventajas significativas de supervivencia en ratones scid/beige que albergan tumores Hep3B intrahepáticos. Se administró a los ratones SNALP PLK1424-2/A que comprende PEG cDMA o PEG-cDSA o SNALP Luc-U/U (PEG-cDMA) a 2 mg/kg dos veces a la semana entre d 10 y d 28 después de siembra (6 dosis). Se evaluó el tiempo hasta eutanasia debido a la carga tumoral en base a valores clínicos como equivalente humano para supervivencia. Ambas composiciones SNALP PLK1424-2/A proporcionaron ventajas significativas de supervivencia sobre el control (p < 0,05, Ensayo de Mantel Cox de rango Log).

La Figura 39 ilustra datos que demuestran la actividad terapéutica de SNALP para PLK-1 que contiene C14 o C18 PEG-lípidos en tumores subcutáneos. (A) Inhibición del crecimiento tumoral subcutáneo por formulaciones alternas de SNALP PLK1424-2/A. Se administró a los ratones SNALP PLK1424-2/A que comprendía PEG-cDMA o PEG-cDSA (6 x 2 mg/kg de forma intravenosa) entre d 10 y d 21 después de siembra de tumor Hep3B. Los valores son volúmenes tumorales medios (mm^3) +/- DT (n = 5). Control = SNALP de ARNip Luc-U/U (PEG-cDMA). (B) Proporción correspondiente de ARNm de hPLK-1:hGAPDH en tumores Hep3B subcutáneos después de una única administración (2 mg/kg) de ARNip PLK1424-2/A o Luc-U/U; Media + DT (n = 4). (C) Respuesta a dosis de SNALP PLK1424-2/A PEG-cDSA en tumores Hep3B. Se administró a ratones que albergaban tumores establecidos (~100 mm^3) SNALP PLK1424-2/A PEG-cDSA (6 x 3, 1, ó 0,5 mg/kg), SNALP Luc PEG-cDSA (6 x 3 mg/kg), o vehículo PBS cada 2-3 días entre los días 18 - 29 después de siembra. Los valores representan volúmenes tumorales medios (mm^3) (n = 5). El tamaño medio de partícula SNALP y (polidispersión) fue 81 (0,10), 71 (0,03), 82 (0,12), y 74 (0,05) nm para PLK1424 PEG-cDMA, PLK1424 PEG-cDSA, Luc PEG-cDMA, y Luc PEG-cDSA, respectivamente.

La Figura 40 ilustra datos que demuestran que diferentes patrones de modificación química en la secuencia de ARNip PLK1424 estaban bien tolerados y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad en la eliminación de células tumorales humanas.

La Figura 41 ilustra datos que demuestran que ARNip modificados PLK1424 no inducían una respuesta de IFN- α que fuera mayor que los controles negativos.

La Figura 42 ilustra datos que demuestran que no había inducción significativa de IFIT1 por encima de la de SNALP vacío con ARNip PLK1424 1/3, PLK1424 2/3, PLK1424 2/4, y PLK1424 2/6.

La Figura 43 ilustra datos que demuestran que todos los ARNip PLK1424 ensayados en tumores Hep3B producían un nivel equivalente de silenciamiento de ARNm de PLK-1 *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

El carcinoma hepatocelular (HCC) es el quinto tumor sólido más común en todo el mundo y la cuarta causa principal de mortalidad por cáncer representando aproximadamente 400.000 muertes anuales (Thomas et al., J. Clin. Oncol., 23:2892-2899 (2005)). Aunque existen varias opciones de tratamiento alternativas para HCC, actualmente no existe régimen quimioterapéutico eficaz para HCC y el pronóstico sigue siendo muy malo. La resección quirúrgica o trasplante completo de hígado se consideran las únicas terapias con potencial curativo; sin embargo, el 70-85% de los pacientes con HCC presentan tumores avanzados y a menudo están comprometidos con enfermedad hepática subyacente lo que contraindica la cirugía invasiva (Llovet et al., J. Natl. Cancer Inst., 100:698-711 (2008)). Recientemente, se ha aprobado el inhibidor multi-quinasa Sorafenib para el tratamiento de HCC inoperable en base

a los datos en fase III que muestran mejoras en el tiempo de supervivencia (10,7 meses frente a 7,9 meses para el placebo) de pacientes con enfermedad avanzada (Llovet et al., J. Hepatol., 48 Supl. 1:S20-37 (2008)). Sin otras opciones de tratamiento disponibles, es probable que Sorafenib llegue a formar parte de la norma asistencial para esta población de pacientes. El hígado es un sitio común de enfermedad metastásica tumoral; por ejemplo, aproximadamente el 50% de los pacientes con cáncer colorrectal desarrollan metástasis al hígado, provocando un aumento significativo en la mortalidad de los pacientes (Steele et al., Annals Surgery, 210:127-138 (1989)). La terapia combinatoria con agentes quimioterapéuticos convencionales y dirigidos administrados de forma sistémica mejora los tiempos de supervivencia de estos pacientes; sin embargo, la cura no quirúrgica para cáncer de colon metastásico sigue siendo evasiva. Está claro que HCC y enfermedad metastásica en el hígado representan una necesidad médica no cumplida significativa que requiere el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para opciones de tratamiento más eficaces.

Los ARN interferentes cortos son moléculas específicas de diana poderosas, diseñadas para suprimir la expresión génica a través del proceso celular endógeno de iARN (Elbashir et al., Nature, 411:494-498 (2001)). Desde la caracterización de este mecanismo de silenciamiento génico fundamental, se han hecho muchos progresos en el desarrollo de ARNip como una clase potencialmente nueva de agente terapéutico para un amplio espectro de enfermedades. Sin embargo, la barrera principal para desarrollar el potencial de los ARNip terapéuticos es la necesidad de vehículos de suministro de fármacos que faciliten el direccionamiento al sitio de enfermedad y el suministro intracelular del ARNip (Zimmermann et al., Nature, 441:111-114 (2006); de Fougères et al., Nat. Rev. Drug Discov., 6:443-453 (2007); Behlke, Mol. Ther., 13:644-670 (2006)). Aunque varios grupos han investigado el uso de química nucleotídica alternativa para mejorar las propiedades farmacológicas de los ARNip (Soutschek et al., Nature, 432:173-178 (2004); Hall et al., Nucleic Acids Res., 32:5991-6000 (2004); Morrissey et al., Hepatology, 41:1349-1356 (2005)), otros grupos ha mejorado el suministro *in vivo* de ARNip formando complejos con policationes tales como polietilenimina (Urban-Klein et al., Gene Ther., 12:461-466 (2005); Schiffelers et al., Nucleic Acids Res., 32:e149 (2004)) y polímeros de ciclodextrina (Heidel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104:5715-5721 (2007)) o por encapsulación en vehículos basados en lípido (Zimmermann et al., *supra*; Morrissey et al., Nat. Biotechnol., 23:1002-1007 (2005); Judge et al., Mol. Ther., 13:494-505 (2006)). Son de particular interés aquellas estrategias dirigidas a aprovechar el efecto de "permeación y retención potenciadas" (Mayer et al., Cancer Letters, 53:183-190 (1990); Seymour, Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 9:135-187 (1992)), también mencionado como direccionamiento pasivo, mediante el cual vehículos de carga neutra de tamaño adecuado pueden pasar a través del epitelio fenestrado observado en sitios de interés clínico tales como tumores. Para aprovechar este efecto y conseguir enriquecimiento significativo en el sitio diana, los vehículos deben ser pequeños (diámetro del orden de 100 nm) y larga vida en circulación, de ese modo capaces de esquivar los lechos microcapilares de los órganos de "primer paso", los pulmones, el hígado y las células fagocíticas del sistema reticuloendotelial. La ventaja de dicho sistema que enriquece la acumulación de ARNip en el sitio diana tumoral ofrece el potencial de desarrollar un agente terapéutico molecular con selectividad adicional sobre la de fármacos de molécula pequeña no dirigidos.

Se han descrito en la bibliografía muchas dianas oncológicas para ARNip, aunque se carece de forma notable de evidencias directas de que los efectos terapéuticos presentados *in vivo* estén mediados por iARN. Las dianas generalmente están en tres amplias categorías: (i) aquellas que están implicadas en el ciclo celular o división celular y son directamente citotóxicas cuando se regulan negativamente; (ii) aquellas que soportan el crecimiento de células tumorales, la progresión del tumor o metástasis tales como factores de crecimiento, sus receptores o factores angiogénicos; y (iii) aquellas que aumentan la sensibilidad del tumor a enfoques terapéuticos convencionales tales como proteínas antiapoptóticas, genes de resistencia a fármacos y enzimas de reparación del ADN. La presente descripción se crea para abordar la expresión de una proteína esencial del ciclo celular, la quinasa 1 tipo Polo (PLK-1).

El progreso a través del ciclo celular está controlado por quinasas, tales como las familias de quinasas dependientes de ciclina y tipo Polo. Las quinasas tipo polo se llaman debido a Polo, una serina/treonina quinasa identificada por primera vez en *Drosophila Melanogaster* y caracterizada por su dominio único de caja polo de unión a fosfopéptido (Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)). Se han caracterizado cuatro miembros de la familia PLK de mamífero, PLK-1, PLK-2 (también conocida como Snk), PLK-3 (también conocida como Prk o Fnk) y PLK-4 (también conocida como Sak) y han demostrado tener tareas no redundantes en la regulación del ciclo celular (Barr et al., *supra*). Todas tiene señales de localización nuclear predichas (Taniguchi et al., J. Biol. Chem., 277:48884-48888 (2002)) y se cree que actúan en concierto con sustratos nucleares implicados en diversas fases del ciclo celular. En células de mamífero, PLK-1 actúa fosforilando la Cdc25C fosfatasa, ciclina B, una subunidad cohesina del huso mitótico, subunidades del complejo promotor de anafase, la proteína 1 tipo quinesina de mamífero MKLP-1 y otras proteínas relacionadas con quinesina. Esta serie diversa de sustratos ilustra las múltiples tareas de PLK en mitosis y citoquinesis (Barr et al., *supra*). La sobreexpresión de PLK-1, observada en muchos tipos de tumores humanos, es un pronosticador negativo del desenlace de los pacientes (Strebhardt et al., Nat. Rev. Cancer, 6:321-330 (2006)), mientras que la inhibición de la actividad PLK-1 induce rápidamente una detención mitótica y apoptosis de la célula tumoral (Steegmaier et al., Curr. Biol., 17:316-322 (2007); Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:5789-5794 (2003)). La eliminación de PLK-1 también actúa sensibilizando las células cancerosas a la actividad pro-apoptótica de fármacos de molécula pequeña (Spankuch et al., Oncogene, 26:5793-5807 (2007)), probablemente debido a su papel funcional en el daño del ADN y los puntos de control del ensamblaje del huso. Estas características se combinan haciendo de PLK-1 una diana excitante para intervención terapéutica en oncología.

Por tanto, el silenciamiento dirigido de genes asociados a cáncer tales como PLK-1 por ARNip resulta considerablemente prometedor como nueva estrategia terapéutica. Sin embargo, las secuencias no modificadas de ARNip para PLK-1 pueden ser inmunoestimuladoras, por ejemplo, estimulan potentes respuestas inflamatorias a partir de células inmunes innatas, particularmente cuando se asocian con vehículos de suministro que facilitan la captación intracelular. Esto representa una barrera significativa al desarrollo terapéutico de moléculas de ARNip para PLK-1 debido a la toxicidad y efectos génicos fuera de diana asociados con la respuesta inflamatoria. La presente descripción supera estas limitaciones reduciendo o anulando completamente la respuesta inmune contra el ARNip de PLK-1 usando la incorporación selectiva de nucleótidos modificados tales como nucleótidos de 2'-O-metil (2'OMe) uridina y/o guanósina en cualquiera o ambas hebras del ARNip. En particular, las propiedades inmunoestimuladoras de las secuencias de ARNip para PLK-1 y su capacidad de silenciar la expresión de PLK-1 pueden equilibrarse u optimizarse mediante la introducción de modificaciones mínimas y selectivas 2'OMe dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNip. Esto puede conseguirse a dosis de ARNip terapéuticamente viables sin inducción de citoquinas, toxicidad, y efectos fuera de diana asociados con el uso de ARNip no modificado.

Por tanto, en este documento se describen moléculas químicamente modificadas de ARNip que silencian la expresión de PLK-1 y métodos para usar las mismas. También se describen en este documento partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que comprenden una molécula modificada de ARNip descrita en este documento, un lípido catiónico, y un lípido no catiónico, que puede comprender adicionalmente un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. Se describen adicionalmente en este documento métodos para silenciar la expresión génica de PLK-1 administrando una molécula modificada de ARNip descrita en este documento a un sujeto mamífero. Ciertas realizaciones descritas en este documento proporcionan un agente terapéutico de ARNip que aborda PLK-1 humana para el tratamiento de cánceres hepáticos tales como HCC y enfermedad metastásica hepática. También se describen en este documento métodos para identificar y/o modificar ARNip para PLK-1 que tiene propiedades inmunoestimuladoras. También se proporcionan métodos para sensibilizar una célula tal como una célula cancerosa a los efectos de un fármaco quimioterapéutico que comprende suministrar secuencialmente ARNip para PLK-1 seguido por el fármaco quimioterapéutico.

Por lo tanto, la presente descripción demuestra que ARNip diseñado de forma racional, cuando se suministra usando un vehículo de suministro sistémico seguro y eficaz, es capaz de afectar al silenciamiento génico de PLK-1 terapéutico a través del mecanismo confirmado de iARN en ausencia de estimulación inmune no pretendida.

II. Definiciones

Como se usa en este documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a los mismos salvo que se especifique otra cosa.

La expresión "quinasa 1 tipo polo", "PLK-1", "quinasa tipo polo", o "PLK" se refiere a la serina/treonina quinasa que contiene dos dominios funcionales: (1) un dominio quinasa; y (2) un dominio de caja polo (véase, por ejemplo, Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)). La actividad y concentración celular de PLK-1 son cruciales para la regulación precisa de la división celular. La expresión y actividad de PLK-1 son bajas en las fases G0, G1, y S del ciclo celular, pero comienzan a elevarse en G2 y alcanzan el máximo durante la fase M. PLK-1 es esencial para la mitosis y división celular y contribuye a los siguientes procesos: maduración del centrosoma y la actividad de factores promotores de la maduración por fosforilación de Cdc25C y ciclinaB1; formación del huso bipolar; y adaptación de los puntos de control de daño en el ADN (el daño en el ADN inhibe PLK-1 en G2 y la mitosis). PLK-1 también está implicada en la activación de componentes del complejo promotor de anafase para la salida mitótica y citoquinesis. PLK-1 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer incluyendo hepatoma y cáncer de colon, y la expresión de PLK-1 a menudo se correlaciona con un mal pronóstico del paciente. La sobreexpresión de PLK-1 (de tipo silvestre o quinasa inactiva) provoca la multinucleación (inestabilidad genética). PLK-1 hiperactiva anula el punto de control de daño en el ADN. La expresión constitutiva de PLK-1 causa transformación de células NIH 3T3. PLK-1 fosforila el supresor tumoral p53, inhibiendo de este modo los efectos pro-apoptóticos de p53. Las secuencias de ARNm de PLK-1 humana se exponen en los Números de Acceso a GenBank NM_005030, X73458, BC014846, BC003002, HSU01038, y L19559. Una secuencia de ARNm de PLK-1 de ratón se expone en el Número de Acceso a GenBank NM_011121. PLK-1 también se conoce como serina/treonina proteína quinasa 13 (STPK13).

La expresión "ARN interferente" o "iARN" o "secuencia de ARN interferente" se refiere a ARN monocatenario (por ejemplo, miARN maduro) o ARN bicatenario (es decir, ARN dúplex tal como ARNip, ARNia, o pre-miARN) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen diana (es decir, mediante la degradación o inhibiendo la traducción de ARNm que son complementarios a la secuencia del ARN interferente) cuando el ARN interferente está en la misma célula que el gen diana. ARN interferente por tanto se refiere al ARN monocatenario que es complementario a una secuencia de ARNm o al ARN bicatenario formando por dos hebras complementarias o por una única hebra auto-complementaria. El ARN interferente puede tener identidad sustancial o completa con el gen diana o puede comprender una región de desapareamiento (es decir, un motivo de desapareamiento). La secuencia del ARN interferente puede corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia del mismo.

ARN interferente incluye "ARN interferente pequeño" o "ARNip", por ejemplo, ARN interferente de aproximadamente 15-60, 15-50, ó 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más típicamente de aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25

(dúplex) nucleótidos de longitud, es preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, ó 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNip bicatenario es de 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, ó 19-25 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, ó 21-23 nucleótidos de longitud, y el ARNip bicatenario es de aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, ó 19-25 pares de bases de longitud, preferiblemente de aproximadamente 18-22, 19-20, ó 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARNip pueden comprender salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o de aproximadamente 2 a de aproximadamente 3 nucleótidos y extremos 5' fosfato. Ejemplos de ARNip incluyen, sin limitación, una molécula polinucleotídica bicatenaria ensamblada a partir de dos moléculas de hebra diferente, donde una hebra es la hebra con sentido y la otra es la hebra antisentido complementaria; una molécula polinucleotídica bicatenaria ensamblada a partir de una molécula de una única hebra, donde las regiones con sentido y antisentido se unen mediante un enlazador basado en ácido nucleico o no basado en ácido nucleico; una molécula polinucleotídica bicatenaria con una estructura secundaria de horquilla que tiene regiones con sentido y antisentido auto-complementarias; y una molécula polinucleotídica monocatenaria circular con dos o más estructuras de bucle y un tronco que tiene regiones con sentido y antisentido auto-complementarias, donde el polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de ARNip bicatenaria activa.

Preferiblemente, los ARNip se sintetizan químicamente. El ARNip también puede generarse por escisión de ARNbc más largos (por ejemplo, ARNbc mayor de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) con la RNasa III de *E. coli* o Dicer. Estas enzimas procesan el ARNbc en ARNip biológicamente activo (véanse, por ejemplo, Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:9942-9947 (2002); Calegari et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:14236 (2002); Byrom et al., Ambion TechNotes, 10(1):4-6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic Acids Res., 31:981-987 (2003); Knight et al., Science, 293:2269-2271 (2001); y Robertson et al., J. Biol. Chem., 243:82 (1968)). Preferiblemente, los ARNbc de al menos 50 nucleótidos a aproximadamente 100, 200, 300, 400, ó 500 nucleótidos de longitud. Un ARNbc puede ser tan largo como de 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos de longitud, o más largos. El ARNbc puede codificar un transcrito génico completo o un transcrito génico parcial. En ciertos casos, el ARNip puede estar codificado por un plásmido (por ejemplo, transcrito como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con bucles de horquilla).

Como se usa en este documento, la expresión "motivo de desapareamiento" o "región de desapareamiento" se refiere a una parte de una secuencia de ARN interferente (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN) que no tiene un 100% de complementariedad con su secuencia diana. Un ARN interferente puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más regiones de desapareamiento. Las regiones de desapareamiento puede ser contiguas o pueden estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más nucleótidos. Los motivos o regiones de desapareamiento pueden comprender un único nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o más nucleótidos.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un ARN interferente es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, por ejemplo, una inhibición de la expresión de una secuencia diana en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia del ARN interferente. La inhibición de la expresión de un gen diana o secuencia diana se consigue cuando el valor obtenido con el ARN interferente respecto al control es de aproximadamente el 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, ó 0%. Ensayos adecuados para medir la expresión de un gen diana o secuencia diana incluyen, por ejemplo, examen de los niveles de proteína o ARNm usando técnicas conocidas para los especialistas en la técnica tales como dot blots, transferencia de Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos para los especialistas en la técnica.

Por "disminuir", "disminución", "reducir", o "reducción" de una respuesta inmune mediante un ARN interferente se pretende indicar una disminución detectable de una respuesta inmune contra un ARN interferente dado (por ejemplo, un ARN interferente modificado). La cantidad de disminución de una respuesta inmune por un ARN interferente modificado puede determinarse respecto al nivel de una respuesta inmune en presencia de un ARN interferente no modificado. Una disminución detectable puede ser de aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, o más inferior que la respuesta inmune detectada en presencia del ARN interferente no modificado. Una disminución en la respuesta inmune contra el ARN interferente se mide típicamente mediante una disminución en la producción de citoquinas (por ejemplo, IFN γ , IFN α , TFN α , IL-6, o IL-12) por una célula respondedora *in vitro* o una disminución en la producción de citoquinas en el suero de un sujeto mamífero después de administración del ARN interferente.

Como se usa en este documento, la expresión "célula respondedora" se refiere a una célula, preferiblemente una célula de mamífero, que produce una respuesta inmune detectable cuando se pone en contacto con un ARN interferente inmunoestimulador tal como un ARNip no modificado. Células respondedoras ejemplares incluyen, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos, y similares. Las respuestas inmunes detectables incluyen, por ejemplo, producción de citoquinas o factores de crecimiento tales como TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TGF, y combinaciones de las mismas.

"Identidad sustancial" se refiere a una secuencia que hibrida con una secuencia de referencia en condiciones rigurosas, o con una secuencia que tiene un porcentaje de identidad especificado sobre una región específica de una secuencia de referencia.

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las cuales un ácido nucleico hibridará con su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Se encuentra una guía extensiva respecto a la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). Generalmente, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C inferiores al punto de fusión térmico (T_m) para una secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (a fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidas) a la cual el 50% de las sondas complementarias a la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas también pueden conseguirse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la de fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo.

Condiciones de hibridación rigurosas ejemplares pueden ser las siguientes: formamida al 50%, SSC 5x, y SDS al 1%, incubando a 42°C, o, SSC 5x, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en SSC 0,2x, y SDS al 0,1% a 65°C. Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variarse entre aproximadamente 32°C y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación por PCR de alta rigurosidad, es típica una temperatura de aproximadamente 62°C, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden variar de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Condiciones de ciclo típicas para amplificaciones tanto de alta como de baja rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90°C-95°C durante 30 seg. - 2 min., una fase de hibridación que dura 30 seg. - 2 min., y una fase de extensión de aproximadamente 72°C durante 1-2 min. Se proporcionan protocolos y directrices para reacciones de amplificación de baja y alta rigurosidad, por ejemplo, en Innis et al. (1990) *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, Inc. N.Y.

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones rigurosas son aun sustancialmente idénticos y los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto sucede, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan en condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. "Condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en SSC 1X a 45°C. Una hibridación positiva es al menos dos veces la de fondo. Los especialistas en la técnica reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones alternativas de hibridación y lavado para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Se proporcionan directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds.

Las expresiones "sustancialmente idéntico" o "identidad sustancial", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de nucleótidos que son iguales (es decir, al menos aproximadamente el 60%, preferiblemente al menos aproximadamente el 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, ó 95% de identidad sobre una región especificada), cuando se comparan o alinean para una correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o región designada medida usando una de los siguientes algoritmos de comparación de secuencia o por alineación manual e inspección visual. Esta definición, cuando el contexto lo indique, también se refiere asimismo al complemento de una secuencia. Preferiblemente, la identidad sustancial existe sobre una región que es de al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, ó 60 nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencia, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Pueden usarse parámetros por defecto del programa, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencia entonces calcula los porcentajes de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en este documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera de varias posiciones contiguas seleccionadas entre el grupo que consiste en aproximadamente 5 a aproximadamente 60, habitualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 45, más habitualmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, en que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia de la misma cantidad de posiciones contiguas después de haber alineado óptimamente las dos secuencias. Son bien conocidos en la técnica métodos de alineación de secuencias para comparación. La alineación

óptima de secuencias para comparación puede realizarse, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), por implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (suplemento 1995)).

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describe en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25:3389-3402 (1977) y Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en este documento, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos descritos en este documento. El software para realizar análisis BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual sucedería un apareamiento entre dos secuencias nucleotídicas por azar. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01, y mucho más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001.

La expresión "ácido nucleico" como se usa en este documento se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria e incluye ADN y ARN. El ADN puede ser en forma de, por ejemplo, moléculas antisentido, ADN plasmídico, ADN pre-condensado, un producto de PCR, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico, o derivados y combinaciones de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARNip, ARN interferente asimétrico (ARNia), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARNt, ARNv, y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos nucleotídicos conocidos o restos o enlaces estructurales modificados, que son sintéticos, de origen natural, y de origen no natural, y que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. Ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, 2'-O-metil ribonucleótidos, y ácidos péptido-nucleicos (PNA). Salvo que se limite específicamente, la expresión abarca ácidos nucleicos que contiene análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. Salvo que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca de forma implícita variantes modificadas de forma conservativa de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP, y secuencias complementarias así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden conseguirse generando secuencias en las cuales una tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzner et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). "Nucleótidos" contiene un azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base, y un grupo fosfato. Los nucleótidos se unen juntos a través de los grupos fosfato. "Bases" incluye purinas y pirimidinas, que incluyen adicionalmente los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina, y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, aunque sin limitación, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, sin limitación, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos, y alquil haluros.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes de longitud parcial o longitud completa necesarias para la producción de un polipéptido o polipéptido precursor.

"Producto génico", como se usa en este documento, se refiere a un producto de un gen tal como un transcrito de ARN o un polipéptido.

El término "lípidico" se refiere a un grupo de compuestos orgánicos que incluye, aunque sin limitación, ésteres de ácidos grasos y se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Habitualmente se dividen en al menos tres clases: (1) "lípidos simples", que incluyen grasas y aceites así como ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen fosfolípidos y glucolípidos; y (3) "lípidos derivados" tales como esteroides.

"Vesícula lipídica" se refiere a cualquier composición lipídica que pueda usarse para suministrar un compuesto tal como un ARN interferente incluyendo, aunque sin limitación, liposomas, donde un volumen acuoso está encapsulado por una bicapa lipídica anfipática; o donde los lípidos recubren un interior que comprende un componente molecular grande, tal como un plásmido que comprende una secuencia de ARN interferente, con un interior acuoso reducido; o agregados lipídicos o micelas, donde el componente encapsulado está contenido dentro

de una mezcla lipídica relativamente desordenada. La expresión vesícula lipídica abarca cualquiera de una diversidad de sistemas de vehículo basados en lípido incluyendo, sin limitación, SPLP, pSPLP, SANLP, liposomas, micelas, virosomas, complejos de lípido-ácido nucleico, y mezclas de los mismos.

Como se usa en este documento, "lípido encapsulado" puede referirse a una formulación lipídica que proporciona un compuesto, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN interferente), con encapsulación completa, encapsulación parcial, o ambas. En una realización preferida descrita en este documento, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la formulación lipídica (por ejemplo, para formar una SPLP, pSPLP, SNALP, u otra partícula de ácido nucleico-lípido).

Como se usa en este documento, el término "SNALP" se refiere a una partícula estable de ácido nucleico-lípido. Una SNALP representa una partícula hecha de lípidos (por ejemplo, un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un lípido conjugado que evita la agregación de la partícula), donde el ácido nucleico (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN, ADNmc, ADNbc, ARNmc, ARN de horquilla corta (ARNhp), ARNbc, o un plásmido, incluyendo plásmidos para los cuales se transcribe un ARN interferente) está completamente encapsulado dentro del lípido. Como se usa en este documento, el término "SNALP" incluye una SPLP, que es el término usado para hacer referencia a una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) encapsulado dentro del lípido. Las SNALP y SPLP típicamente contienen un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un conjugado lipídico (por ejemplo, un conjugado PEG-lípido). Las SNALP y SPLP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que pueden mostrar tiempos prolongados en circulación después de inyección intravenosa (i.v.), pueden acumularse en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración) y pueden mediar la expresión del gen transfectado o silenciamiento de la expresión del gen diana en estos sitios distales. Las SPLP incluyen "pSPLP", que comprenden un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado expuesto en la publicación PCT N° WO 00/03683.

Las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento típicamente tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, más típicamente de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, más típicamente de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, mucho más típicamente de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento, son resistentes en solución acuosa a degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen en, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040142025 y la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070042031.

"Formulación lipídica" o, como alternativa, una "formulación basada en lípido" se usa en este documento para hacer referencia a una SNALP que puede usarse para suministrar un ácido nucleico, tal como un ARN interferente, a un sitio diana de interés. En la formulación lipídica, que se forma típicamente a partir de un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un conjugado lipídico, el ácido nucleico se encapsula en el lípido, protegiendo de este modo el ácido nucleico de la degradación por nucleasa.

La expresión "conjugado lipídico" se refiere a un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas de ácido nucleico-lípido. Dichos conjugados lipídicos incluyen, aunque sin limitación, oligómeros de poliamida (por ejemplo, conjugados ATTA-lípido), conjugados PEG-lípido, tales como PEG acoplado a dialquiloxypropilos, PEG acoplado a diacilglicerolos, PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, PEG conjugado con ceramidas (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.885.613), PEG lípidos catiónicos, y mezclas de los mismos. El PEG puede conjugarse directamente con el lípido o puede unirse al lípido mediante un resto enlazador. Puede usarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplar el PEG a un lípido incluyendo, por ejemplo, restos enlazadores que no contiene éster y restos enlazadores que contiene éster. En realizaciones preferidas descritas en este documento, se usan restos enlazadores que no contienen éster.

La expresión "lípido anfipático" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado donde la parte hidrófoba del material lipídico se orienta dentro de una fase hidrófoba, mientras que la parte hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas derivan de la presencia de grupos polares o cargados tales como carbohidratos, fosfato, ácido carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo, y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede conferirse por la inclusión de grupos apolares que incluyen, aunque sin limitación, grupos de hidrocarburo alifático saturado e insaturado de cadena larga y dichos grupos sustituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos, o heterocíclicos. Ejemplos de compuestos anfipáticos incluyen, aunque sin limitación, fosfolípidos, aminolípidos, y esfingolípidos.

Ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, aunque sin limitación, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, disteareoilfosfatidilcolina, y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicosfingolípidos, diacilglicerolos, y β -aciloxiácidos, también están dentro del grupo designado como lípido anfipáticos. Adicionalmente, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos incluyendo triglicéridos y esteroides.

La expresión "lípidos neutros" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que existen en forma no cargada o neutra zwitteriónica a un pH seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos, y diacilglicerol.

- 5 La expresión "lípidos no catiónicos" se refiere a cualquier lípido anfipático así como cualquier otro lípido neutro o lípido aniónico.

La expresión "lípidos aniónicos" se refiere a cualquier lípido que está cargado negativamente a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, aunque sin limitación, fosfatidilglicerol, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoil fosfatidiletanolaminas, N-succinil fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilglicerol, palmitoiloleilfosfatidilglicerol (POPG), y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

La expresión "lípidos catiónicos" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que portan una carga positiva neta a un pH seleccionado, tal como pH fisiológico (por ejemplo, pH de aproximadamente 7,0). Se ha descubierto sorprendentemente que los lípidos catiónicos que comprenden cadenas alquilo con múltiples sitios de insaturación, por ejemplo, al menos dos o tres sitios de insaturación, son particularmente útiles para formar partículas de ácido nucleico-lípido con fluidez aumentada de membrana. Varios lípidos catiónicos y análogos relacionados, que son también útiles como se describe en este documento, se han descrito en las publicaciones de patentes de Estados Unidos N° 20060083780 y 20060240554; las patentes de Estados Unidos N° 5.208.036; 5.264.618; 5.279.833; 5.283.185; 5.753.613; y 5.785.992; y la publicación PCT N° WO 96/10390. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, aunque sin limitación, 1,2-dilinoil-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoil-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), dioctadecildimetilamonio (DODMA), diestearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3 - (N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiriloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethyl amonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 2,3-Dilinoiloxi-N,N-dimetilpropilamina (DLinDAP), 1,2-N,N'-Dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLin-carbDAP), 1,2-Dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLinCDAP), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-XTC2-DMA), y mezclas de los mismos. En algunos casos, los lípidos catiónicos comprenden un grupo de cabeza amina terciaria protonable, cadenas alquilo C18, enlaces éter entre el grupo de cabeza y las cadenas alquilo, y de 0 a 3 dobles enlaces. Dichos lípidos incluyen, por ejemplo, DSDMA, DLinDMA, DLenDMA, y DODMA. Los lípidos catiónicos también pueden comprender enlaces éter y grupos de cabeza valorables por pH. Dichos lípidos incluyen, por ejemplo, DODMA.

La expresión "lípidos hidrófobos" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, aunque sin limitación, grupos hidrocarburo alifáticos saturado e insaturado de cadena larga y dichos grupos opcionalmente sustituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos, o heterocíclicos. Ejemplos adecuados incluyen, aunque sin limitación, diacilglicerol, dialquilglicerol, N,N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano, y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de un liposoma, una SNALP, u otro sistema de suministro de fármaco de fusionarse con membranas de una célula. Las membranas pueden ser la membrana plasmática o membranas que rodean orgánulos, por ejemplo, endosoma, núcleo, etc.

Como se usa en este documento, la expresión "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende en su totalidad o en parte, agua.

Como se usa en este documento, la expresión "solución de lípido orgánico" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, un disolvente orgánico que tiene un lípido.

"Sitio distal", como se usa en este documento, se refiere a un sitio separado físicamente, que no está limitado a un lecho capilar adyacente, pero incluye sitios ampliamente distribuidos en todo el organismo.

"Estable en suero" en relación a partículas de ácido nucleico-lípido significa que la partícula no se degrada significativamente después de exposición a un ensayo de suero o nucleasa que degradaría significativamente el ADN o ARN libre. Ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo de suero convencional, un ensayo de ADNasa, o un ensayo de ARNasa.

"Suministro sistémico", como se usa en este documento, se refiere al suministro que conduce a una amplia biodistribución de un compuesto tal como un ARN interferente dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir al suministro sistémico de ciertos compuestos, pero no otros. El suministro sistémico

significa que una cantidad útil, preferiblemente terapéutica, de un compuesto se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. Para obtener una amplia biodistribución generalmente se requiere una vida en sangre para que le compuesto no se degrade o elimine rápidamente (tal como por órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o por unión celular rápida, no específica) antes de alcanzar un sitio de enfermedad distal al sitio de administración. El suministro sistémico de partículas de ácido nucleico-lípido puede ser por cualquier medio conocido en la técnica incluyendo, por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, e intraperitoneal. En una realización preferida descrita en este documento, el suministro sistémico de partículas de ácido nucleico-lípido es por suministro intravenoso.

"Suministro local", como se usa en este documento, se refiere al suministro de un compuesto tal como un ARN interferente directamente a un sitio diana dentro de un organismo. Por ejemplo, un compuesto puede suministrarse localmente por inyección directa en un sitio de enfermedad tal como un tumor u otro sitio diana tal como un sitio de inflamación o un órgano diana tal como el hígado, corazón, páncreas, riñón, o similares.

El término "mamífero" se refiere a cualquier especie de mamífero tal como un ser humano, ratón, rata, perro, gato, hámster, cobaya, conejo, ganado bovino, y similares.

El término "cáncer" se refiere a cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres conocidos y afecciones neoplásicas, estén caracterizadas como malignas, benignas, de tejido blando, o sólido, y cánceres de todas las fases y grados incluyendo cánceres pre y post-metastásicos. Ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, cáncer hepático, cáncer pulmonar, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer del intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer esofágico; cáncer de vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer de apéndice, cáncer de mama, cáncer de ovario; cáncer cervical, cáncer de próstata, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer del sistema nervioso central, glioblastoma, cáncer cutáneo, linfomas, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, sarcomas osteogénicos, y cánceres sanguíneos. Ejemplos no limitantes de tipos específicos de cáncer hepático incluyen carcinoma hepatocelular, cáncer hepático secundario (causado por metástasis de algún otro tipo de célula cancerosa no hepática), y hepatoblastoma. Como se usa en este documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

III. Descripción detallada

En este documento se describen composiciones que comprenden ARN interferente (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN, etc.) que aborda la expresión de PLK-1 y métodos para usar dichas composiciones para silenciar la expresión de PLK-1.

En una realización descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende nucleótidos modificados seleccionados entre el grupo que consiste en 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA), y mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende 2'OMe nucleótidos. Como ejemplo no limitante, los 2'OMe nucleótidos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

En otra realización descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En ciertos casos, la molécula modificada de ARNip comprende nucleótidos modificados en una hebra de la molécula modificada de ARNip. En otros ciertos casos, la molécula modificada de ARNip comprende nucleótidos modificados en ambas hebras de la molécula modificada de ARNip. Típicamente, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más de los nucleótidos en la región bicatenaria comprende nucleótidos modificados.

En algunas realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 25% de los nucleótidos en la región bicatenaria comprende nucleótidos modificados. En otras realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 20% de los nucleótidos en la región bicatenaria comprende nucleótidos modificados. En otras realizaciones más descritas en este documento, menos de aproximadamente el 15% de los nucleótidos en la región bicatenaria comprende nucleótidos modificados. En realizaciones adicionales descritas en este documento, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% de los nucleótidos en la región bicatenaria comprende nucleótidos modificados.

En una realización adicional, la molécula modificada de ARNip es menos inmunoestimuladora que una secuencia no modificada correspondiente de ARNip. En dichas realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip con propiedades inmunoestimuladoras reducidas retiene ventajosamente la actividad iARN frente a la secuencia diana de PLK-1. En otra realización, las propiedades inmunoestimuladoras de las moléculas modificadas de ARNip descritas en este documento y su capacidad para silenciar la expresión de PLK-1 pueden equilibrarse u optimizarse mediante la introducción de modificaciones 2'OMe mínimas y selectivas dentro de la secuencia de ARNip tal como, por ejemplo, dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNip.

En ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip es al menos aproximadamente un 70% menos inmunoestimuladora que la secuencia correspondiente no modificada de ARNip. En otros ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip tiene una CI_{50} que menor de o igual a diez veces la de la secuencia correspondiente no modificada de ARNip.

En algunos casos, la molécula modificada de ARNip comprende salientes 3' en una hebra de la molécula modificada de ARNip. En otros casos, la molécula modificada de ARNip comprende salientes 3' en ambas hebras de la molécula modificada de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende una estructura de bucle en horquilla.

La molécula modificada de ARNip típicamente comprende una hebra con sentido, una hebra antisentido, o una hebra con sentido y una hebra antisentido que tienen uno o más nucleótidos modificados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra con sentido expuestas en la Tabla 1. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 1. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 3. En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra antisentido expuestas en la Tabla 1. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 2. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 4. Como se describe en este documento, uno o más de los nucleótidos en las secuencias de hebra con sentido y/o antisentido expuestas en la Tabla 1 pueden comprender nucleótidos modificados, donde los nucleótidos modificados están localizados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contienen salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contienen salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En casos adicionales descritos en este documento, el saliente 3' en la hebra con sentido, hebra antisentido, o ambas hebras comprende uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, 2'OMe nucleótidos).

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra con sentido expuestas en la Tabla 2. En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra antisentido expuestas en la Tabla 2. Como se describe en este documento, uno o más de los nucleótidos en las secuencias de hebra con sentido y/o antisentido expuestas en la Tabla 2 pueden comprender nucleótidos modificados, donde los nucleótidos modificados están localizados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En casos adicionales descritos en este documento, el saliente 3' en la hebra con sentido, hebra antisentido, o ambas hebras comprenden uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, 2'OMe nucleótidos).

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra con sentido no modificadas expuestas en la Tabla 3. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 51. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 58. En otra realización preferida más descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 65. En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra antisentido no modificadas expuestas en la Tabla 3. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 52. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 59. En otra realización preferida más descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 66. Como se describe en este documento, uno o más de los nucleótidos en las secuencias no modificadas de hebra con sentido y/o antisentido expuestas en la Tabla 3 pueden comprender nucleótidos modificados, donde los nucleótidos modificados están localizados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contienen salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contienen salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En casos adicionales descritos en este documento, el saliente 3' en la hebra con sentido, hebra antisentido, o ambas hebras comprende uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados tales como los

descritos en este documento (por ejemplo, 2'OMe nucleótidos).

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias modificadas de hebra con sentido expuestas en la Tabla 3. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 57. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 64. En otra realización preferida más descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 67. En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la hebra complementaria de la secuencia diana. En casos adicionales descritos en este documento, el saliente 3' en la hebra con sentido comprende uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, 2'OMe nucleótidos).

En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias modificadas de hebras antisentido expuestas en la Tabla 3. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 54. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 56. En otra realización preferida más descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 63. En una realización preferida adicional descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 68. En algunos casos descritos en este documento, la hebra antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana. En casos adicionales descritos en este documento, el saliente 3' en la hebra antisentido comprende uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, 2'OMe nucleótidos).

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra con sentido expuestas en las Tablas 4-5. En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra antisentido expuestas en las Tablas 4-5. Como se describe en este documento, uno o más de los nucleótidos en las secuencias de hebra con sentido y/o antisentido expuestas en las Tablas 4-5 pueden comprender nucleótidos modificados, donde los nucleótidos modificados están localizados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En casos adicionales descritos en este documento, el saliente 3' en la hebra con sentido, hebra antisentido, o ambas hebras comprenden uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, 2'OMe nucleótidos).

En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias no modificadas de hebra con sentido expuestas en la Tabla 6. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 211. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 218. En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias no modificadas de hebra antisentido expuestas en la Tabla 6. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 212. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 219. Como se describe en este documento, uno o más de los nucleótidos en las secuencias no modificadas de hebra con sentido y/o antisentido expuestas en la Tabla 6 pueden comprender nucleótidos modificados, donde los nucleótidos modificados están localizados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, uno o ambos de los nucleótidos uridina en el saliente 3' "UU" en la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe uridina).

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias modificadas de hebra con sentido expuestas en la Tabla 6. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 214. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 220. En algunos casos descritos en este documento, uno o ambos de los nucleótidos uridina en el saliente 3' "UU" en la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe uridina).

En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias modificadas de hebra antisentido expuestas en la Tabla 6. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 215. En otra realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 216. En otra realización preferida más descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 223. En algunos casos descritos en este documento, uno o ambos de los nucleótidos uridina en el saliente 3' "UU" en la hebra antisentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe uridina).

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias de hebra con sentido expuestas en la Tabla 7. En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es complementaria a una de las secuencias de hebra con sentido expuestas en la Tabla 7 (excepto para el saliente 3' "UU"). Como se describe en este documento, uno o más de los nucleótidos en la secuencia con sentido expuesta en la Tabla 7 y/o las secuencias complementarias de hebra antisentido pueden comprender nucleótidos modificados, donde los nucleótidos modificados están localizados en la región bicatenaria de la molécula de ARNip. En algunos casos descritos en este documento, uno o ambos de los nucleótidos uridina en el saliente 3' "UU" en la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe uridina).

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias modificadas de hebra con sentido expuestas en la Tabla 10. En una realización preferida, la hebra con sentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 400. En otras realizaciones descritas en este documento, la hebra antisentido de la molécula modificada de ARNip comprende o consiste en una de las secuencias modificadas de hebra antisentido expuesta en la Tabla 10. En una realización preferida descrita en este documento, la hebra antisentido comprende o consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 403. En algunos casos descritos en este documento, uno o ambos de los nucleótidos en el saliente 3' en la hebra antisentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como los descritos en este documento (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe uridina).

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip se selecciona entre el grupo que consiste en una cualquiera o más de las moléculas de ARNip expuestas en la Tabla 11. En realizaciones preferidas descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip es PLK1424 2/6.

En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, la molécula modificada de ARNip se selecciona entre el grupo que consiste en PLK1424 2/6, PLK1424 U4/GU, PLK1424 U4/G, PLK773 G/GU, PLK1425 3/5, y una mezcla de las mismas.

En otra realización, la molécula modificada de ARNip comprende adicionalmente un sistema vehículo. En ciertos casos, el sistema de vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en una partícula de ácido nucleico-lípido, un liposoma, una micela, un virosoma, un complejo de ácido nucleico, y mezclas de los mismos. Generalmente, el complejo de ácido nucleico puede comprender el ARNip modificado en complejo con un lípido catiónico, un polímero catiónico, una ciclodextrina, o mezclas de los mismos. Como ejemplo no limitante, la molécula modificada de ARNip puede estar en complejo con un polímero catiónico, donde el polímero catiónico es polietilenimina (PEI). En realizaciones preferidas, el sistema de vehículo es una partícula de ácido nucleico-lípido.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), dioctadecildimetilamonio (DODMA), diestearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3 - (N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoil)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-octadecadienoil)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 2,3-Dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina (DLinDAP), 1,2-N,N'-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLin-carbDAP), 1,2-Dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLinCDAP), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-XTC2-DMA), y mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico es DLinDMA.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico es un lípido aniónico. En otras ciertas realizaciones, el lípido no catiónico es un lípido neutro.

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoil oleil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleil-fosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol, y una mezcla de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido no catiónico es DSPC, DPPC, o DSPE.

En otra realización descrita en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. En ciertos casos descritos en este documento, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, o un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido, y una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones descritas en este documento, el conjugado de PEG-lípido es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG dialquiloxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), y mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende un conjugado PEG- dialquiloxipropilo (PEG-DAA). En ciertos casos descritos en este documento, el conjugado PEG-DAA es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un conjugado de PEG-dilauriloxipropilo (C₁₂), un conjugado PEG-dimiristiloxipropilo (C₁₄), un conjugado PEG-dipalmitiloxipropilo (C₁₆), y un conjugado PEG-diesteariloxipropilo (C₁₈). En una realización preferida descrita en este documento, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de PEG-dimiristiloxipropilo (C₁₄). Conjugados adicionales de PEG-lípido incluyen, por ejemplo, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el lípido catiónico comprende de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 50% en mol del lípido total presente en la partícula. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico comprende aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula.

En otras realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico comprende de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 90% en mol del lípido total presente en la partícula. En ciertos casos descritos en este documento, el lípido no catiónico comprende aproximadamente el 10% en mol del lípido total presente en la partícula. En ciertos otros casos descritos en este documento, el lípido no catiónico comprende aproximadamente el 60% en mol del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones adicionales descritas en este documento, el conjugado de PEG-DAA comprende del 0% en mol a aproximadamente el 20% en mol del lípido total presente en la partícula. En una realización preferida descrita en este documento, el conjugado de PEG-DAA comprende aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones adicionales, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente colesterol. En ciertos casos descritos en este documento, el colesterol comprende de aproximadamente el 10% en mol a aproximadamente el 60% en mol del lípido total presente en la partícula. En una realización preferida descrita en este documento, el colesterol comprende aproximadamente el 48% en mol del lípido total presente en la partícula.

En otra realización descrita en este documento, el ARNip modificado en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de exposición de la partícula a una nucleasa a 37°C durante 20 minutos. En una realización relacionada descrita en este documento, el ARNip modificado en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de incubación de la partícula en suero a 37°C durante 30 minutos. En una realización preferida descrita en este documento, el ARNip modificado está completamente encapsulado en la partícula de ácido nucleico-lípido.

En ciertos casos descritos en este documento, la partícula tiene una proporción másica de ARNip:lípido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2. En otros ciertos casos descritos en este documento, la partícula tiene una proporción másica de ARNip:lípido de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1. En otros casos más descritos en este documento, la partícula tiene una proporción másica de ARNip:lípido de aproximadamente 0,08.

En algunos casos descritos en este documento, la partícula tiene un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm. En otros casos descritos en este documento, la partícula tienen un diámetro medio de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm.

También se describe en este documento una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

- (a) una molécula de ARNip que silencia la expresión de PLK-1;
- (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 85% en mol del lípido total presente en la partícula;
- (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 13% en mol a aproximadamente el 49,5% en

mol del lípido total presente en la partícula; y

(d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

5 En una realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En otra realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende al menos una de las secuencias expuestas en las Tablas 1-7 y 10-11.

10 En ciertas realizaciones descritas en este documento, el lípido catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en DLinDMA, DLenDMA, DODAC, DDAB, DOTAP, DSDMA, DOTMA, DODMA, DC-Chol, DMRIE, DOSPA, DOGS, CLinD-MA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, DLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, y una mezcla de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico comprende DLinDMA.

15 En otra realización descrita en este documento, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo. En ciertos casos descritos en este documento, el colesterol o derivado de colesterol comprende de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 45% en mol del lípido total presente en la partícula. Generalmente, el derivado de colesterol es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en colestanol, colestanona, colesteno, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, y colesteryl-4'-hidroxibutil éter.

20 En una realización alternativa descrita en este documento, el lípido no catiónico comprende un fosfolípido. En otra realización alternativa, el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo. En dichas realizaciones descritas en este documento, el fosfolípido se selecciona entre el grupo que consiste en DPPC, DSPC, DOPE, POPC, POPE, POPG, DPPE, DMPE, DSPE, DEPE, SOPE, EPC, monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, y una mezcla de los mismos. En ciertos casos descritos en este documento, el fosfolípido comprende de aproximadamente el 4% en mol a aproximadamente el 10% en mol del lípido total presente en la partícula y el colesterol comprende de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula. En una realización preferida descrita en este documento, el fosfolípido comprende DPPC.

30 En otra realización más descrita en este documento, el lípido que inhibe la agregación de partículas en un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido, y una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones descritas en este documento, el conjugado de PEG-lípido es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un PEG-diacilglicerol (DAG), un PEG dialquiloxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), y una mezcla de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende un conjugado PEG-dialquiloxipropilo (PEG-DAA). En ciertos casos descritos en este documento, el conjugado PEG-DAA es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un conjugado de PEG-dilauriloxipropilo (C₁₂), un conjugado PEG-dimiristiloxipropilo (C₁₄), un conjugado PEG-dipalmitiloxipropilo (C₁₆), y un conjugado PEG-diesteariloxipropilo (C₁₈). En una realización preferida descrita en este documento, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de PEG-dimiristiloxipropilo (C₁₄). En otra realización preferida descrita en este documento, el conjugado PEG-DAA comprende un conjugado PEG-diesteariloxipropilo (C₁₈). Conjugados adicionales de PEG-lípido incluyen, por ejemplo, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, o mezclas de los mismos.

45 En una realización adicional descrita en este documento, el ácido nucleico en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de exposición de la partícula a una nucleasa a 37°C durante 20 minutos. En una realización relacionada descrita en este documento, el ácido nucleico en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de incubación de la partícula en suero a 37°C durante 30 minutos. En una realización preferida descrita en este documento, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula de ácido nucleico-lípido.

50 En ciertas realizaciones descritas en este documento, la partícula tiene una proporción másica lípido:ARNip de aproximadamente 1 a aproximadamente 100. En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, la partícula tiene una proporción másica lípido:ARNip de aproximadamente 5 a aproximadamente 15. Preferiblemente, la partícula tiene una proporción másica lípido:ARNip de aproximadamente 6. En algunos casos descritos en este documento, la partícula tiene un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm. En otros casos descritos en este documento, la partícula tienen un diámetro medio de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm.

60 Se describe adicionalmente en este documento una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

(a) una molécula de ARNip que silencia la expresión de PLK-1;

(b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 56,5% en mol a aproximadamente el 66,5% en mol del lípido total presente en la partícula;

65 (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 31,5% en mol a aproximadamente el 42,5% en mol del lípido total presente en la partícula; y

(d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

En una realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En otra realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende al menos una de las secuencias expuestas en las Tablas 1-7 y 10-11.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el lípido catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en DLinDMA, DLenDMA, DODAC, DDAB, DOTAP, DSDMA, DOTMA, DODMA, DC-Chol, DMRIE, DOSPA, DOGS, CLinD-MA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, DLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, y una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el lípido catiónico comprende DLinDMA.

En otras realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo. Preferiblemente, el lípido no catiónico comprende colesterol.

En realizaciones adicionales descritas en este documento, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas es un conjugado de PEG-lípido seleccionado entre el grupo que consiste en un PEG-diacilglicerol, un PEG dialquiloxypropilo, un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida, y una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende un conjugado PEG-DAA. Conjugados adicionales de PEG-lípido incluyen, por ejemplo, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, o mezclas de los mismos.

Otra realización preferida descrita en este documento proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido, que comprende:

- (a) una molécula de ARNip que silencia la expresión de PLK-1;
- (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 52% en mol a aproximadamente el 62% en mol del lípido total presente en la partícula;
- (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 36% en mol a aproximadamente el 47% en mol del lípido total presente en la partícula; y
- (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1% en mol a aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

En una realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En otra realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende al menos una de las secuencias expuestas en las Tablas 1-7 y 10-11.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el lípido catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en DLinDMA, DLenDMA, DODAC, DDAB, DOTAP, DSDMA, DOTMA, DODMA, DC-Chol, DMRIE, DOSPA, DOGS, CLinD-MA, CpLinDMA, DMOBA, DOcarbDAP, DLinDAP, DLincarbDAP, DLinCDAP, DLin-K-DMA, DLin-K-XTC2-DMA, y una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el lípido catiónico comprende DLinDMA.

En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico comprende un fosfolípido. En realizaciones alternativas, el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo. El fosfolípido puede ser, por ejemplo, DPPC, DSPC, DOPE, POPC, POPE, POPG, DPPE, DMPE, DSPE, DEPE, SOPE, EPC, monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el lípido no catiónico comprende una mezcla de DPPC y colesterol. En dichos casos, el DPPC típicamente comprende de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 9% en mol del lípido total presente en la partícula y el colesterol típicamente comprende de aproximadamente el 32% en mol a aproximadamente el 37% en mol del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones adicionales descritas en este documento, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas es un conjugado de PEG-lípido seleccionado entre el grupo que consiste en un PEG-diacilglicerol, un PEG dialquiloxypropilo, un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida, o una mezcla de los mismos. Preferiblemente, el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende un conjugado PEG-DAA. Conjugados adicionales de PEG-lípido incluyen, por ejemplo, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, o mezclas de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método *in vitro* para introducir un ARNip que silencie la expresión de la quinasa 1 tipo polo (PLK-1) en una célula, comprendiendo el método:

- poner en contacto la célula con una molécula modificada de ARNip de la invención, o una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico.

En una realización descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip es un sistema de vehículo. El sistema de vehículo puede ser, por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido, un liposoma, una micela, un virosoma, un complejo de ácido nucleico, o una mezcla de los mismos. Típicamente, el complejo de ácido nucleico

comprende la molécula modificada de ARNip en complejo con un lípido catiónico, u polímero catiónico, una ciclodextrina, o una mezcla de los mismos. En ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada ARNip está en complejo con un polímero catiónico, donde el polímero catiónico es polietilenimina (PEI). En una realización preferida, el sistema de vehículo es una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: la molécula modificada de ARNip; un lípido catiónico; y un lípido no catiónico.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de partículas. En otras realizaciones, la presencia de la partícula de ácido nucleico-lípido es detectable al menos 1 hora después de la administración de la partícula. En otras realizaciones más descritas en este documento, más del 10% de una pluralidad de las partículas está presente en el plasma de un mamífero aproximadamente 1 hora después de la administración. En realizaciones adicionales descritas en este documento, la célula está en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una molécula modificada de ARNip de la invención o una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico, para su uso en un método para el suministro *in vivo* de un ARNip que silencie la expresión de la quinasa 1 tipo polo (PLK-1), comprendiendo dicho método administrar dicha molécula de ARNip o dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un sujeto mamífero *in vivo*.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la administración se selecciona entre el grupo que consiste en oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, o intradérmica. En una realización preferida descrita en este documento, el sujeto mamífero es un ser humano.

También se describe en este documento un método para tratar el cáncer en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende administrar al sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en este documento.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el cáncer es cáncer hepático (por ejemplo, carcinoma hepatocelular). En una realización preferida descrita en este documento, el sujeto mamífero es un ser humano.

En una realización descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip es un sistema de vehículo. El sistema de vehículo puede ser, por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido, un liposoma, una micela, un virosoma, un complejo de ácido nucleico, o una mezcla de los mismos. Típicamente, el complejo de ácido nucleico comprende la molécula modificada de ARNip en complejo con un lípido catiónico, u polímero catiónico, una ciclodextrina, o una mezcla de los mismos. En ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada ARNip está en complejo con un polímero catiónico, donde el polímero catiónico es polietilenimina (PEI). En una realización preferida, el sistema de vehículo es una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: la molécula modificada de ARNip; un lípido catiónico; y un lípido no catiónico.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de partículas. En otras realizaciones descritas en este documento, la administración se selecciona entre el grupo que consiste en oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, e intradérmica. En una realización preferida, el sujeto mamífero es un ser humano.

Se describe en este documento un método para tratar el cáncer en un sujeto mamífero que lo necesite, que comprende administrar al sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una molécula modificada de ARNip descrita en este documento.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el cáncer es cáncer hepático (por ejemplo, carcinoma hepatocelular). En una realización preferida, el sujeto mamífero es un ser humano.

Un aspecto adicional descrito en este documento proporciona un método para modificar un ARNip inmunoestimulador que silencia la expresión de PLK-1, comprendiendo el método:

- (a) proporcionar una secuencia no modificada de ARNip capaz de silenciar la expresión de PLK-1, donde la secuencia no modificada de ARNip tiene propiedades inmunoestimuladoras y comprende una secuencia bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud; y
- (b) modificar la secuencia no modificada de ARNip sustituyendo uno o más nucleótidos con nucleótidos modificados, generando de ese modo una molécula modificada de ARNip que es menos inmunoestimuladora que la secuencia no modificada de ARNip y es capaz de silenciar la expresión de PLK-1.

En una realización descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende nucleótidos modificados seleccionados entre el grupo que consiste en 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA), y mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula modificada

de ARNip comprende 2'OMe nucleótidos. Como ejemplo no limitante, los 2'OMe nucleótidos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

Típicamente se sustituyen dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más de los nucleótidos en la secuencia no modificada de ARNip con nucleótidos modificados. En algunas realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 25% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados. En otras realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 20% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados. En otras realizaciones más descritas en este documento, menos de aproximadamente el 15% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados. En realizaciones adicionales descritas en este documento, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados.

En ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip es al menos aproximadamente un 70% menos inmunoestimuladora que la secuencia no modificada de ARNip. En otros ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip tiene una CI_{50} que es menor de o igual a diez veces la de la secuencia no modificada de ARNip.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el método comprende adicionalmente: (c) confirmar que la molécula modificada de ARNip es menos inmunoestimuladora poniendo en contacto la molécula modificada de ARNip con una célula respondedora de mamífero en condiciones adecuadas para que la célula respondedora produzca una respuesta inmune detectable.

Un aspecto relacionado descrito en este documento proporciona un método para identificar y modificar un ARNip inmunoestimulador que silencie la expresión de PLK-1, comprendiendo el método:

- (a) poner en contacto una secuencia no modificada de ARNip capaz de silenciar la expresión de PLK-1 con una célula respondedora de mamífero en condiciones adecuadas para que la célula respondedora produzca una respuesta inmune detectable;
- (b) identificar la secuencia no modificada de ARNip como ARNip inmunoestimulador mediante la presencia de una respuesta inmune detectable en la célula respondedora; y
- (c) modificar la secuencia no modificada de ARNip sustituyendo uno o más nucleótidos con nucleótidos modificados, generando de ese modo una molécula modificada de ARNip que es menos inmunoestimuladora que la secuencia no modificada de ARNip.

En una realización descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende nucleótidos modificados seleccionados entre el grupo que consiste en 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA), y mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula modificada de ARNip comprende 2'OMe nucleótidos. Como ejemplo no limitante, los 2'OMe nucleótidos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

Típicamente se sustituyen dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más de los nucleótidos en la secuencia no modificada de ARNip con nucleótidos modificados. En algunas realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 25% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados. En otras realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 20% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados. En otras realizaciones más descritas en este documento, menos de aproximadamente el 15% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados. En realizaciones adicionales descritas en este documento, de aproximadamente el 10% a aproximadamente el 20% de los nucleótidos en la región bicatenaria de la secuencia no modificada de ARNip están sustituidos con nucleótidos modificados.

En ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip es al menos aproximadamente un 70% menos inmunoestimuladora que la secuencia no modificada de ARNip. En otros ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip tiene una CI_{50} que es menor de o igual a diez veces la de la secuencia no modificada de ARNip.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la célula respondedora de mamífero es una célula mononuclear de sangre periférica o célula dendrítica. En otras realizaciones descritas en este documento, la respuesta inmune detectable comprende la producción de una citoquina o factor de crecimiento seleccionado entre el grupo que consiste en TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12, y combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales descritas en este documento, la respuesta inmune detectable comprende la inducción de proteína

inducida por interferón con ARNm de repeticiones de tetratricopéptido 1 (IFIT1).

En otro aspecto, la presente invención proporciona un ARNip modificado de la invención, o un sistema de vehículo de la invención, para su uso en un método *in vivo* para sensibilizar una célula cancerosa a los efectos de un fármaco quimioterapéutico, comprendiendo el método: poner en contacto la célula cancerosa con dicha molécula de ARNip antes de administrar el fármaco quimioterapéutico; opcionalmente donde: (a) la célula cancerosa está en un mamífero; o (b) el fármaco quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en paclitaxel, fluorouracilo (5-FU), irinotecano, sorafenib, y mezclas de los mismos.

En una realización descrita en este documento, la molécula de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. En otra realización descrita en este documento, la célula se pone en contacto con una molécula modificada de ARNip que silencia la expresión de PLK-1. En ciertos casos descritos en este documento, uno o más de los nucleótidos en la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados. Preferiblemente, los nucleótidos modificados se seleccionan entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos. En otros ciertos casos descritos en este documento, la molécula modificada de ARNip es menos inmunoestimuladora que una secuencia no modificada correspondiente de ARNip.

En algunas realizaciones, la molécula de ARNip está en un sistema de vehículo. Ejemplos no limitantes de sistemas de vehículo incluyen una partícula de ácido nucleico-lípido, un liposoma, una micela, un virosoma, un complejo de ácido nucleico, y una mezcla de los mismos. En una realización preferida, el sistema de vehículo es una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: la molécula de ARNip; un lípido catiónico; y un lípido no catiónico.

En otras realizaciones descritas en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de partículas. En ciertos casos descritos en este documento, la célula es una célula cancerosa. En una realización adicional, la célula cancerosa está en un mamífero. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el fármaco quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en paclitaxel, fluorouracilo (5-FU), irinotecano, sorafenib, y mezclas de los mismos.

Se describen adicionalmente en este documento composiciones que comprenden las moléculas de ARN interferente asimétrico (ARNia) descritas en este documento que abordan la expresión de PLK-1 y métodos para usar dichas composiciones para silenciar la expresión de PLK-1.

En una realización descrita en este documento, la molécula de ARNia comprende una región bicatenaria (dúplex) de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos (apareados) de longitud, donde la molécula de ARNia comprende una hebra antisentido que comprende salientes 5' y 3', y donde la molécula de ARNia es capaz de silenciar la expresión de PLK-1.

En ciertos casos descritos en este documento, la molécula de ARNia comprende una región bicatenaria (dúplex) de aproximadamente 12-20, 12-19, 12-18, 13-17, ó 14-17 nucleótidos (apareados) de longitud, más típicamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, ó 20 nucleótidos (apareados) de longitud. En otros ciertos casos descritos en este documento, los salientes 5' y 3' en la hebra antisentido comprenden secuencias que son complementarias al ARNm de PLK-1 diana, y pueden comprender opcionalmente también secuencias no dirigidas. En algunas realizaciones descritas en este documento, cada uno de los salientes 5' y 3' en la hebra antisentido comprende o consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más nucleótidos. Moléculas ARNia ejemplares dirigidas al ARNm de PLK-1 se proporcionan en la Tabla 8.

En otras realizaciones descritas en este documento, la molécula de ARNia comprende nucleótidos modificados seleccionados entre el grupo que consiste en 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA), y mezclas de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula modificada de ARNia comprende 2'OMe nucleótidos. Como ejemplo no limitante, los 2'OMe nucleótidos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

Aspectos relacionados descritos en este documento proporcionan composiciones que comprenden las moléculas de microARN (miARN) descritas en este documento que abordan la expresión de PLK-1 y métodos para usar dichas composiciones para silenciar la expresión de PLK-1.

En una realización descrita en este documento, la molécula de miARN comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, donde la molécula de miARN es capaz de silenciar la expresión de PLK-1.

En ciertos casos descritos en este documento, la molécula de miARN comprende aproximadamente 15-50, 15-40, ó 15-30 nucleótidos de longitud, más típicamente aproximadamente 15-25 ó 19-25 nucleótidos de longitud, y son

preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, ó 21-23 nucleótidos de longitud. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula de miARN es una molécula madura de miARN dirigida al ARNm de PLK-1. Moléculas de miARN ejemplares dirigidas al ARNm de PLK-1 se proporcionan en la Tabla 9.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la molécula de miARN comprende nucleótidos modificados seleccionados entre el grupo que consiste en 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA), y mezclas de los mismos. En una realización descrita en este documento, la molécula modificada de miARN comprende 2'OMe nucleótidos. Como ejemplo no limitante, los 2'OMe nucleótidos pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

IV. ARN interferente

A. ARNip

Las moléculas no modificadas y modificadas de ARNip descritas en este documento son capaces de silenciar la expresión de PLK-1 y son típicamente de aproximadamente 15 a 60 nucleótidos de longitud. Las moléculas modificadas de ARNip son generalmente menos inmunoestimuladoras que una secuencia correspondiente de ARNip no modificada y retienen actividad de iARN contra la secuencia diana de PLK-1. En algunas realizaciones descritas en este documento, el ARNip modificado contiene al menos un nucleótido de 2'OMe purina o pirimidina tal como un nucleótido de 2'OMe-guanosina, 2'OMe-uridina, 2'OMe-adenosina, y/o 2'OMe-citosina. En realizaciones preferidas, uno o más de los nucleótidos de uridina y/o guanosina están modificados. Los nucleótidos modificados pueden estar presentes en una hebra (es decir, con sentido o antisentido) o ambas hebras del ARNip. Las secuencias de ARNip pueden tener salientes (por ejemplo, salientes 3' o 5' como se describe en Elbashir et al., Genes Dev., 15:188 (2001) o Nykanen et al., Cell, 107:309 (2001)), o pueden carecer de salientes (es decir, tener extremos romos).

El ARNip modificado generalmente comprende de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 100% (por ejemplo, aproximadamente el 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de nucleótidos modificados en la región bicatenaria del dúplex de ARNip. En ciertas realizaciones descritas en este documento, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En algunas realizaciones descritas en este documento, menos de aproximadamente el 25% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En otras realizaciones descritas en este documento, de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 25% (por ejemplo, de aproximadamente el 1%-25%, 2%-25%, 3%-25%, 4%-25%, 5%-25%, 6%-25%, 7%-25%, 8%-25%, 9%-25%, 10%-25%, 11%-25%, 12%-25%, 13%-25%, 14%-25%, 15%-25%, 16%-25%, 17%-25%, 18%-25%, 19%-25%, 20%-25%, 21%-25%, 22%-25%, 23%-25%, o 24%-25%) o de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 20% (por ejemplo, de aproximadamente el 1%-20%, 2%-20%, 3%-20%, 4%-20%, 5%-20%, 6%-20%, 7%-20%, 8%-20%, 9%-20%, 10%-20%, 11%-20%, 12%-20%, 13%-20%, 14%-20%, 15%-20%, 16%-20%, 17%-20%, 18%-20%, o 19%-20%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En otras realizaciones descritas en este documento, por ejemplo, cuando una o ambas hebras del ARNip están modificadas selectivamente en nucleótidos de uridina y/o guanosina, el ARNip modificado resultante puede comprender menos de aproximadamente el 30% de nucleótidos modificados (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% de nucleótidos modificados) o de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 30% de nucleótidos modificados (por ejemplo, de aproximadamente el 1%-30%, 2%-30%, 3%-30%, 4%-30%, 5%-30%, 6%-30%, 7%-30%, 8%-30%, 9%-30%, 10%-30%, 11%-30%, 12%-30%, 13%-30%, 14%-30%, 15%-30%, 16%-30%, 17%-30%, 18%-30%, 19%-30%, 20%-30%, 21%-30%, 22%-30%, 23%-30%, 24%-30%, 25%-30%, 26%-30%, 27%-30%, 28%-30%, o 29%-30% de nucleótidos modificados).

1. Selección de secuencias de ARNip

Las secuencias adecuadas de ARNip descritas en este documento pueden identificarse usando cualquier medio conocido en la técnica. Típicamente, los métodos descritos en Elbashir et al., Nature, 411:494-498 (2001) y Elbashir et al., EMBO J., 20:6877-6888 (2001) se combinan con normas de diseño racional expuestas en Reynolds et al., Nature Biotech., 22(3):326-330 (2004).

Generalmente, la secuencia de nucleótidos 3' del codón de inicio AUG de un transcrito desde el gen diana de interés se explora para secuencias de dinucleótidos (por ejemplo, AA, NA, CC, GG, o UU, donde N = C, G, o U) (véase, por ejemplo, Elbashir et al., EMBO J., 20:6877-6888 (2001)). Los nucleótidos inmediatamente 3' a las secuencias de

dinucleótidos se identifican como secuencias potenciales de ARNip (es decir, una secuencia diana o una secuencia de hebra con sentido). Típicamente, los 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, o más nucleótidos inmediatamente 3' a las secuencias de dinucleótidos se identifican como secuencias potenciales de ARNip. En algunas realizaciones descritas en este documento, la secuencia de dinucleótidos es una secuencia AA o NA y los 19 nucleótidos inmediatamente 3' al dinucleótido AA o NA se identifican como secuencias potenciales de ARNip. Las secuencias de ARNip habitualmente se espacian en posiciones diferentes a lo largo de la longitud del gen diana. Para potenciar adicionalmente la eficacia de silenciamiento de las secuencias de ARNip, pueden analizarse las secuencias potenciales de ARNip para identificar sitios que no contengan regiones de homología con otras secuencias codificantes, por ejemplo, en la célula u organismo diana. Por ejemplo, una secuencia adecuada de ARNip de aproximadamente 21 pares de bases típicamente no tendrá más de 16-17 pares de bases contiguas de homología con las secuencias codificantes en la célula u organismo diana. Si las secuencias de ARNip tienen que expresarse a partir de un promotor de ARN Pol III, se seleccionan secuencias de ARNip que carecen de más de 4 A o T contiguas.

Una vez se ha identificado la secuencia potencial de ARNip, puede diseñarse una secuencia complementaria (es decir, una secuencia de hebra antisentido). También puede analizarse una secuencia potencial de ARNip usando una diversidad de criterios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para potenciar su eficacia de silenciamiento, las secuencias de ARNip pueden analizarse mediante un algoritmo de diseño racional para identificar secuencias que tengan una o más de las siguientes características: (1) contenido en G/C de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 60% de G/C; (2) al menos 3 A/U en las posiciones 15-19 de la hebra con sentido; (3) ninguna repetición interna; (4) una A en la posición 19 de la hebra con sentido; (5) una A en la posición 3 de la hebra con sentido; (6) una U en la posición 10 de la hebra con sentido; (7) ninguna G/C en la posición 19 de la hebra con sentido; y (8) ninguna G en la posición 13 de la hebra con sentido. Pueden encontrarse herramientas de diseño de ARNip que incorporan algoritmos que asignan valores adecuados de cada una de estas características y son útiles para la selección de ARNip en, por ejemplo, <http://boz094.ust.hk/RNAi/siRNA>. Un especialista en la técnica apreciará que pueden seleccionarse secuencias con una o más de las características anteriores para análisis y ensayo adicional como secuencias potenciales de ARNip.

Además, a menudo pueden eliminarse como ARNip secuencias potenciales de ARNip con uno o más de los siguientes criterios: (1) secuencias que comprenden un tramo de 4 o más de la misma base en una fila; (2) secuencias que comprenden homopolímeros de G (es decir, para reducir posibles efectos no específicos debido a características estructurales de estos polímeros); (3) secuencias que comprenden motivos de triple base (por ejemplo, GGG, CCC, AAA, o TTT); (4) secuencias que comprenden tramos de 7 o más G/C en una fila; y (5) secuencias que comprenden repeticiones directas de 4 o más bases dentro de los candidatos que provocan estructuras plegadas internas. Sin embargo, un especialista en la técnica apreciará que secuencias con una o más de las características anteriores aún pueden seleccionarse para análisis y ensayo adicional como secuencias potenciales de ARNip.

En algunas realizaciones descritas en este documento, las secuencias potenciales de ARNip pueden analizarse adicionalmente en base a asimetría de dúplex de ARNip como se describe en, por ejemplo, Khvorova et al., Cell, 115:209-216 (2003); y Schwarz et al., Cell, 115:199-208 (2003). En otras realizaciones descritas en este documento, las secuencias potenciales de ARNip pueden analizarse adicionalmente en base a la estructura secundaria en el sitio diana de ARNm como se describe en, por ejemplo, Luo et al., Biophys. Res. Commun., 318:303-310 (2004). Por ejemplo, puede modelarse la estructura secundaria de ARNm usando el algoritmo Mfold (disponible en <http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/rna/form1.cgi>) para seleccionar secuencias de ARNip que favorezcan la accesibilidad al sitio diana de ARNm donde está presente menos estructura secundaria en forma de apareamiento de bases y troncos-bucles.

Una vez se ha identificado una secuencia potencial de ARNip, la secuencia puede analizarse para la presencia de cualquier propiedad inmunoestimuladora, por ejemplo, usando un ensayo de citoquinas *in vitro* o un modelo animal *in vivo*. Los motivos en la hebra con sentido y/o antisentido de la secuencia de ARNip tales como motivos ricos en GU (por ejemplo, 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3', etc.) también pueden proporcionar una indicación de si la secuencia puede ser inmunoestimuladora. Una vez descubierto que una molécula de ARNip es inmunoestimuladora, puede después modificarse para disminuir sus propiedades inmunoestimuladoras como se describe en este documento. Como ejemplo no limitante, una secuencia de ARNip puede ponerse en contacto con una célula respondedora de mamífero en condiciones tales que la célula produzca una respuesta inmune detectable para determinar si el ARNip es un ARNip inmunoestimulador o no inmunoestimulador. La célula respondedora de mamífero puede ser de un mamífero virgen (es decir, un mamífero que no ha estado previamente en contacto con el producto génico de la secuencia de ARNip). La célula respondedora de mamífero puede ser, por ejemplo, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un macrófago, y similares. La respuesta inmune detectable puede comprender la producción de una citoquina o factor de crecimiento tal como, por ejemplo, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12, o una combinación de los mismos. Una molécula de ARNip identificada como inmunoestimuladora puede después modificarse para disminuir sus propiedades inmunoestimuladoras reemplazando al menos uno de los nucleótidos en la hebra con sentido y/o antisentido con nucleótidos modificados. Por ejemplo, menos de aproximadamente el 30% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del dúplex de ARNip pueden reemplazarse con nucleótidos modificados tales

como 2'OMe nucleótidos. El ARNip modificado después puede ponerse en contacto con una célula respondedora de mamífero como se ha descrito anteriormente para confirmar que sus propiedades inmunoestimuladoras se han reducido o anulado.

Ensayos adecuados *in vitro* para detectar una respuesta inmune incluyen, aunque sin limitación, la técnica de inmunoensayo de tipo sándwich con doble anticuerpo monoclonal de David et al. (patente de Estados Unidos N° 4.376.110); ensayos de tipo sándwich con anticuerpo monoclonal-policlonal (Wide et al., en Kirkham y Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. y S. Livingstone, Edimburgo (1970)); el método de "transferencia de Western" de Gordon et al. (patente de Estados Unidos N° 4.452.901); inmunoprecipitación de ligando marcado (Brown et al., J. Biol. Chem., 255:4980-4983 (1980)); ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA) como se describe, por ejemplo, por Raines et al., J. Biol. Chem., 257:5154-5160 (1982); técnicas inmunocitoquímicas, incluyendo el uso de fluorocromos (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 39:477 (1980)); y neutralización de actividad (Bowen-Pope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2396-2400 (1984)). Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, están disponibles varios inmunoensayos diferentes, incluyendo aquellos descritos en las patentes de Estados Unidos N° 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Un ejemplo no limitante de un modelo *in vivo* para detectar una respuesta inmune incluye un ensayo de inducción de citoquinas de ratón *in vivo* como se describe en, por ejemplo, Judge et al., Mol. Ther., 13:494-505 (2006). En ciertas realizaciones descritas en este documento, el ensayo que puede realizarse es el siguiente: (1) el ARNip puede administrarse por inyección intravenosa convencional en la vena lateral de la cola; (2) puede recogerse sangre por punción cardíaca aproximadamente 6 horas después de la administración y procesarse como plasma para el análisis de citoquinas; y (3) pueden cuantificarse las citoquinas usando kits de ELISA de tipo sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, IFN- α de ratón y humano (PBL Biomedical; Piscataway, NJ); IL-6 y TNF- α humanos (eBioscience; San Diego, CA); e IL-6, TNF- α , e IFN- γ de ratón (BD Biosciences; San Diego, CA)).

Están disponibles en el mercado anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a citoquinas y factores de crecimiento de múltiples fuentes y pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler et al., Nature, 256: 495-497 (1975) y Harlow y Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publication, Nueva York (1999)). La generación de anticuerpos monoclonales se ha descrito previamente y puede realizarse mediante cualquier medio conocido en la técnica (Buhring et al., en Hybridoma, Vol. 10, N° 1, pág. 77-78 (1991)). En algunos métodos, el anticuerpo monoclonal se marca (por ejemplo, con cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos, o químicos) para facilitar la detección.

2. Generación de moléculas de ARNip

El ARNip puede proporcionarse en varias formas incluyendo, por ejemplo, como uno o más dúplex de ARN interferente pequeño (ARNip) aislados, como ARN bicatenario (ARNbc) más largo, o como ARNip o ARNbc transcrito a partir de un casete de transcripción en un plásmido de ADN. Las secuencias de ARNip puede tener salientes (por ejemplo, salientes 3' o 5' como se describe en Elbashir et al., Genes Dev., 15:188 (2001) o Nykanen et al., Cell, 107:309 (2001), o pueden carecer de salientes (es decir, tener extremos romos).

Puede usarse una población de ARN para proporcionar ARN precursores largos, o puede usarse ARN precursores largos que tengan identidad sustancial o completa con una secuencia diana seleccionada para preparar el ARNip. Los ARN pueden aislarse de células o tejido, sintetizarse, y/o clonarse de acuerdo con métodos bien conocidos para los especialistas en la técnica. El ARN puede ser una población mixta (obtenida de células o tejido, transcrito a partir de ADNc, sustraído, seleccionado, etc.), o puede representar una única secuencia diana. El ARN puede ser de origen natural (por ejemplo, aislado de muestras tisulares o celulares), sintetizado *in vitro* (por ejemplo, usando polimerasa T7 o SP6 y productos de PCR o un ADNc clonado), o sintetizado químicamente.

Para formar un ARNbc, para ARN sintéticos, el complemento también se transcribe *in vitro* y se hibrida para formar un ARNbc. Si se usa una población de ARN de origen natural, también se proporcionan los complementos de ARN (por ejemplo, para formar ARNbc para digestión por ARNasa III de *E. coli* o Dicer), por ejemplo, transcribiendo ADNc correspondientes a la población de ARN, o usando ARN polimerasas. Los ARN precursores después se hibridan para formar ARN bicatenarios para digestión. Los ARNbc pueden administrarse directamente a un sujeto o pueden digerirse *in vitro* antes de su administración.

Los métodos para aislar ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, preparar y seleccionar bibliotecas de ADNc, y realizar PCR son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., *supra*; Ausubel et al., *supra*), así como los métodos de PCR (véanse, las patentes de Estados Unidos 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)). Las bibliotecas de expresión también son conocidas para los especialistas en la técnica. Textos básicos adicionales que describen los métodos generales de uso en esta descripción incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994).

Preferiblemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los oligonucleótidos que comprenden las moléculas de ARNip descritas en este documento pueden sintetizarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Usman et al., J. Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); y Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997). La síntesis de oligonucleótidos hace uso de grupos comunes de protección y acoplamiento de ácido nucleico, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Como ejemplo no limitante, pueden realizarse síntesis a pequeña escala en un sintetizador de Applied Biosystems usando un protocolo a escala de 0,2 μ mol. Como alternativa, pueden realizarse síntesis a la escala de 0,2 μ mol en un sintetizador de placa de 96 pocillos de Protogene (Palo Alto, CA). Sin embargo, una escala mayor o menos de síntesis también está dentro del alcance de la presente descripción. Los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, métodos para la desprotección de ARN, y métodos para la purificación de ARN son conocidos para los especialistas en la técnica.

Las moléculas de ARNip descritas en este documento también pueden sintetizarse mediante una técnica de síntesis en tándem, donde ambas hebras se sintetizan como un único fragmento oligonucleotídico continuo o hebra separada por un enlazador escindible que se escinde posteriormente para proporcionar fragmentos o hebras diferentes que hibriden para formar el dúplex de ARNip. El enlazador puede ser un enlazador polinucleotídico o un enlazador no nucleotídico. La síntesis en tándem de ARNip puede adaptarse fácilmente a plataformas de síntesis multipocillo/multiplaca así como plataformas de síntesis a gran escala empleando reactores discontinuos, columnas de síntesis, y similares. Como alternativa, las moléculas de ARNip pueden ensamblarse a partir de dos oligonucleótidos distintos, donde un oligonucleótido comprende la hebra con sentido y el otro comprende la hebra antisentido del ARNip. Por ejemplo, cada hebra puede sintetizarse por separado y unirse juntas por hibridación o ligamiento después de síntesis y/o desprotección. En otros ciertos casos descritos en este documento, las moléculas de ARNip pueden sintetizarse como un único fragmento oligonucleotídico continuo, donde las regiones con sentido y antisentido auto-complementarias hibridan para formar un dúplex de ARNip que tiene estructura secundaria de horquilla.

3. Modificación de secuencias de ARNip

En ciertos aspectos, las moléculas de ARNip descritas en este documento comprenden un dúplex que tiene dos hebras y al menos un nucleótido modificado en la región bicatenaria, donde cada hebra es de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. De forma ventajosa, el ARNip modificado es menos inmunoestimulador que una secuencia correspondiente de ARNip no modificado, pero retiene la capacidad de silenciar la expresión de una secuencia diana. En realizaciones preferidas, el grado de modificaciones químicas introducidas en la molécula de ARNip afecta al equilibrio entre la reducción o anulación de las propiedades inmunoestimuladoras del ARNip y la retención de la actividad iARN. Como ejemplo no limitante, una molécula de ARNip que aborda PLK-1 puede modificarse mínimamente (por ejemplo, menos de aproximadamente el 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5% modificada) en nucleótidos selectivos de uridina y/o guanosa dentro del dúplex de ARNip para eliminar la respuesta inmune generada por el ARNip reteniendo al mismo tiempo su capacidad de silenciar la expresión de PLK-1.

Ejemplos de nucleótidos modificados adecuados para su uso como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación, ribonucleótidos que tienen un grupo 2'-O-metilo (2'OMe), 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), 2'-desoxi, 5-C-metilo, 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), 4'-tio, 2'-amino, o 2'-C-alilo. Los nucleótidos modificados que tienen una formación Northern tal como los descritos en, por ejemplo, Saenger, Principles of Nucleic Acid Structure, Springer-Verlag Ed. (1984), también son adecuados para su uso en las moléculas de ARNip descritas en este documento. Dichos nucleótidos modificados incluyen, sin limitación, nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA) (por ejemplo, 2'-O, 4'-C-metileno-(D-ribofuranosil) nucleótidos), 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, 2'-metil-tio-etil nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-cloro (2'Cl) nucleótidos, y 2'-azido nucleótidos. En ciertos casos, las moléculas de ARNip descritas en este documento incluyen uno o más nucleótidos de pinza de G. Un nucleótido de pinza de G se refiere a un análogo de citosina modificado donde las modificaciones confieren la capacidad de formar enlaces de hidrógeno con las caras tanto de Watson-Crick como de Hoogsteen de un nucleótido complementario de guanina dentro de un dúplex (véase, por ejemplo, Lin et al., J. Am. Chem. Soc., 120:8531-8532 (1998)). Además, pueden incorporarse nucleótidos que tienen un análogo de base nucleotídica tal como, por ejemplo, C-fenilo, C-naftilo, otros derivados aromáticos, inosina, azol carboxamidas, y derivados de nitroazol tales como 3-nitropirrol, 4-nitroindol, 5-nitroindol, y 6-nitroindol (véase, por ejemplo, Loakes, Nucl. Acids Res., 29:2437-2447 (2001)) en las moléculas de ARNip descritas en este documento.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, las moléculas de ARNip descritas en este documento comprenden adicionalmente una o más modificaciones químicas tales como restos de capuchón terminal, modificaciones del esqueleto fosfato, y similares. Ejemplos de restos de capuchón terminal incluyen, sin limitación, restos abásicos desoxi invertidos, modificaciones con glicerilo, 4',5'-metileno nucleótidos, 1-(β -D-eritrofuranosil) nucleótidos, 4'-tio nucleótidos, nucleótidos carbocíclicos, 1,5-anhidrohexitol nucleótidos, L-nucleótidos, α -nucleótidos, nucleótidos de base modificada, *treo*-pentofuranosil nucleótidos, 3',4'-seco nucleótidos acíclicos, 3,4-dihidroxibutil nucleótidos acíclicos, 3,5-dihidroxipentil nucleótidos acíclicos, restos nucleotídicos 3'-3'-invertidos, restos abásicos 3'-3'-invertidos, restos nucleotídicos 3'-2'-invertidos, restos abásicos 3'-2'-invertidos, restos nucleotídicos 5'-5'-

invertidos, restos abásicos 5'-5'-invertidos, restos abásicos desoxi 3'-5'-invertidos, 5'-amino-alkil fosfato, 1,3-diamino-2-propil fosfato, 3-aminopropil fosfato, 6-aminohexil fosfato, 1,2-aminododecil fosfato, hidroxipropil fosfato, 1,4-butanodiol fosfato, 3'-fosforamidato, 5'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexil fosfato, 3'-fosfato, 5'-amino, 3'-fosforotioato, 5'-fosforotioato, fosforoditioato, y metilfosfonato de unión o no de unión o restos 5'-mercapto (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.998.203; Beaucage et al., *Tetrahedron* 49:1925 (1993)). Ejemplos no limitantes de modificaciones del esqueleto fosfato (es decir, que provocan enlaces internucleotídicos modificados) incluyen sustituciones fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato, carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal, y alquilsililo (véase, por ejemplo, Hunziker et al., *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, en *Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker et al., *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, en *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39 (1994)). Dichas modificaciones químicas pueden suceder en el extremo 5' y/o extremo 3' de la hebra con sentido, la hebra antisentido, o ambas hebras del ARNip.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido de la molécula de ARNip puede comprender adicionalmente un saliente 3'-terminal que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 (por ejemplo, 1, 2, 3 ó 4) 2'-desoxi ribonucleótidos y/o cualquier combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Ejemplos adicionales de nucleótidos modificados y tipos de modificaciones químicas que pueden introducirse en las moléculas modificadas de ARNip descritas en este documento se describen, por ejemplo, en la patente de Reino Unido N° GB 2.397.818 B y las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20040192626, 20050282188, y 20070135372.

Las moléculas modificadas de ARNip descritas en este documento pueden comprender opcionalmente uno o más no nucleótidos en una o ambas hebras del ARNip. Como se usa en este documento, el término "no nucleótido" se refiere a cualquier grupo o compuesto que pueda incorporarse en una cadena de ácido nucleico en el lugar de una o más unidades nucleotídicas, incluyendo sustituciones del azúcar y/o fosfato, y permite que las bases restantes muestren su actividad. El grupo o compuestos es abásico porque no contiene una base nucleotídica habitualmente reconocida tal como adenosina, guanina, citosina, uracilo, o timina y por lo tanto carece de una base en la posición 1'.

En otras realizaciones descritas en este documento, la modificación química del ARNip comprende unir un conjugado a la molécula químicamente modificada de ARNip. El conjugado puede unirse en el extremo 5' y/o 3' de la hebra con sentido y/o antisentido del ARNip químicamente modificado mediante una unión covalente tal como, por ejemplo, un enlazador biodegradable. El conjugado también puede unirse al ARNip químicamente modificado, por ejemplo, a través de un grupo carbamato u otro grupo de unión (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20050074771, 20050043219, y 20050158727). En ciertos casos descritos en este documento, el conjugado es una molécula que facilita el suministro del ARNip químicamente modificado en una célula. Ejemplos de moléculas de conjugado adecuadas para su unión al ARNip químicamente modificado descrito en este documento incluyen, sin limitación, esteroides tales como colesterol, glicoles tales como polietilenglicol (PEG), albúmina sérica humana (HSA), ácidos grasos, carotenoides, terpenos, ácidos biliares, folatos (por ejemplo, ácido fólico, análogos de folato y derivados de los mismos), azúcares (por ejemplo, galactosa, galactosamina, N-acetil galactosamina, glucosa, manosa, fructosa, fucosa, etc.), fosfolípidos, péptidos, ligandos para receptores celulares capaces de mediar la captación celular, y combinaciones de los mismos (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20030130186, 20040110296, y 20040249178; la patente de Estados Unidos N° 6.753.423). Otros ejemplos incluyen las moléculas de conjugado de resto lipófilo, vitamina, polímero, péptido, proteína, ácido nucleico, molécula pequeña, oligosacárido, grupo de carbohidrato, intercalante, agente de unión al surco menor, agente de escisión, y agente reticulante descritas en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20050119470 y 20050107325. Otros ejemplos más incluyen las moléculas de conjugado de 2'-O-alkil amina, 2'-O-alkoxi-alkil amina, poliamina, pirimidina modificada C5-catiónica, péptido catiónico, grupo guanidinio, grupo amidinino, aminoácido catiónico descritas en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20050153337. Ejemplos adicionales incluyen las moléculas de conjugado de grupo hidrófobo, compuesto activo de membrana, compuesto de penetración celular, señal de direccionamiento celular, modificador de interacción, y estabilizador estérico descritas en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040167090. Ejemplos adicionales incluyen las moléculas de conjugado descritas en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20050239739. El tipo de conjugado usado y el grado de conjugación con la molécula de ARNip químicamente modificado pueden evaluarse para perfiles farmacocinéticos mejorados, biodisponibilidad, y/o estabilidad del ARNip reteniendo al mismo tiempo la actividad iARN. Por tanto, un especialista en la técnica puede seleccionar moléculas químicamente modificadas de ARNip que tienen diversos conjugados unidos a las mismas para identificar las que tienen perfiles mejorados y actividad iARN completa usando cualquiera de una diversidad de modelos bien conocidos de cultivo celular *in vitro* o animales *in vivo*.

B. ARNia

Como el ARNip, el ARN interferente asimétrico (ARNia) puede reclutar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y conducir a silenciamiento eficaz de una diversidad de genes en células de mamífero mediando la escisión específica de secuencia del ARNm diana entre el nucleótido 10 y 11 respecto al extremo 5' de la hebra antisentido (Sun et al., *Nat. Biotech.*, 26:1379-1382 (2008)). Típicamente, una molécula de ARNia comprende un

dúplex corto de ARN que tiene una hebra con sentido y una hebra antisentido, donde el dúplex contiene salientes en los extremos 3' y 5' de la hebra antisentido. El ARNia es generalmente asimétrico porque la hebra con sentido es más corta en ambos extremos en comparación con la hebra antisentido complementaria. En algunos aspectos, las moléculas de ARNia descritas en este documento pueden diseñarse, sintetizarse, e hibridarse en condiciones similares a las usadas para moléculas de ARNip. Como ejemplo no limitante, las secuencias de ARNia pueden seleccionarse y generarse usando los métodos descritos anteriormente para seleccionar secuencias de ARNip.

En otra realización descrita en este documento, pueden diseñarse dúplex de ARNia de diversas longitudes (por ejemplo, aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17, o 14-17 pares de bases, más típicamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 pares de bases) con salientes en los extremos 3' y 5' de la hebra antisentido para abordar un ARNm de interés. En ciertos casos, la hebra con sentido de la molécula de ARNia es de aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17, o 14-17 nucleótidos de longitud, más típicamente de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos de longitud. En otros ciertos casos descritos en este documento, la hebra antisentido de la molécula de ARNia es de aproximadamente 15-60, 15-50, o 15-40 nucleótidos de longitud, más típicamente de aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, y es preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el saliente antisentido 5' contiene uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no de direccionamiento (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", etc.). En otras realizaciones descritas en este documento, el saliente antisentido 3' contiene uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no de direccionamiento (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", etc.). En ciertos aspectos, las moléculas de ARNia descritas en este documento pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, por ejemplo, en la región bicatenaria (dúplex) y/o en los salientes antisentido. Como ejemplo no limitante, las secuencias de ARNia pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para secuencias de ARNip. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula de ARNia comprende 2'OMe nucleótidos tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, o mezclas de los mismos.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la molécula de ARNia descrita en este documento comprende una hebra antisentido que corresponde a la hebra antisentido de una molécula de ARNip, por ejemplo, una de las moléculas de ARNip descritas en este documento que presenta actividad de silenciamiento de PLK-1. En algunos casos descritos en este documento, los ARNia que abordan el ARNm de PLK-1 se administran usando un sistema de vehículo descrito en este documento tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida descrita en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNia que aborda el ARNm de PLK-1; (b) un lípido catiónico (por ejemplo, DLinDMA); y (c) un lípido no catiónico (por ejemplo, DSPC, DPPC, DSPE, y/o colesterol). En ciertos casos descritos en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender adicionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (por ejemplo, PEG-DAA). Se proporcionan ejemplos no limitantes de moléculas de ARNia adecuadas para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1 en la Tabla 8 del Ejemplo 17.

C. miARN

Generalmente, los microARN (miARN) son moléculas de ARN monocatenarias de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica. Los miARN están codificados por genes a partir de cuyo ADN se transcriben, pero los miARN no se traducen en proteína (ARN no codificante); en su lugar, cada transcrito primario (un pri-miARN) se procesa en una corta estructura de tronco-bucle llamada pre-miARN y finalmente en un miARN maduro funcional. Las moléculas de miARN maduro son parcial o completamente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm), y su función principal es regular negativamente la expresión génica. La identificación de miARN se describe, por ejemplo, en Lagos-Quintana et al., *Science*, 294:853-858; Lau et al., *Science*, 294:858-862; y Lee et al., *Science*, 294:862-864.

Los genes que codifican miARN son mucho más largos que la molécula procesada de miARN maduro. Los miARN primero se transcriben como transcritos primarios o pri-miARN con un capuchón y cola poli-A y se procesan en estructuras cortas, de ~70 nucleótidos de tronco-bucle conocidas como pre-miARN en el núcleo celular. Este procesamiento se realiza en animales mediante un complejo proteico conocido como complejo microprocesador, que consiste en la nucleasa Drosha y la proteína de unión a ARN bicatenario Pasha (Denli et al., *Nature*, 432:231-235 (2004)). Estos pre-miARN después se procesan en miARN maduros en el citoplasma mediante interacción con la endonucleasa Dicer, que también inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Bernstein et al., *Nature*, 409:363-366 (2001)). Cualquiera de la hebra con sentido o la hebra antisentido de ADN puede funcionar como molde para dar lugar a miARN.

Cuando Dicer escinde el tronco-bucle del pre-miARN, se forma dos moléculas de ARN cortas complementarias, pero solamente una se integra en el complejo RISC. Esta hebra se conoce como hebra guía y se selecciona por la proteína argonauta, la RNasa catalíticamente activa en el complejo RISC, en base a la estabilidad del extremo 5' (Preall et al., *Curr. Biol.*, 16:530-535 (2006)). La hebra restante, conocida como hebra anti-guía o pasajera, se degrada como un sustrato del complejo RISC (Gregory et al., *Cell*, 123:631-640 (2005)). Después de su integración en el complejo RISC activo, los miARN forman apareamiento de bases con sus moléculas complementarias de

ARNm e inducen la degradación del ARNm diana y/o el silenciamiento traduccional.

Los miARN de mamífero habitualmente son complementarios a un sitio en la UTR 3' de la secuencia de ARNm diana. En ciertos casos, la hibridación del miARN con el ARNm diana inhibe la traducción en proteína mediante el bloqueo de la maquinaria de traducción en proteína. En otros ciertos casos, la hibridación del miARN al ARNm diana facilita la escisión y degradación del ARNm diana a través de un proceso similar a la interferencia de ARN (iARN). Los miARN también pueden abordar la metilación de sitios genómicos que corresponden con ARNm diana. Generalmente, los miARN funcionan en asociación con un complemento de proteínas colectivamente llamado miRNP.

En ciertos aspectos descritos en este documento, las moléculas de miARN descritas en este documento son de aproximadamente 15-100, 15-90, 15-80, 15-75, 15-70, 15-60, 15-50, o 15-40 nucleótidos de longitud, más típicamente de aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, y son preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 nucleótidos de longitud. En otros ciertos aspectos descritos en este documento, las moléculas de miARN descritas en este documento pueden comprender uno o más nucleótidos modificados. Como ejemplo no limitante, las secuencias de miARN pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para secuencias de ARNip. En una realización preferida descrita en este documento, la molécula de miARN comprende 2'OMe nucleótidos tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones descritas en este documento, los miARN que abordan el ARNm de PLK-1 se administran usando un sistema de vehículo descrito en este documento tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida descrita en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de miARN que abordan el ARNm de PLK-1; (b) un lípido catiónico (por ejemplo, DLinDMA); y (c) un lípido no catiónico (por ejemplo, DSPC, DPPC, DSPE, y/o colesterol). En ciertos casos descritos en este documento, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender adicionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (por ejemplo, PEG-DAA). Se proporcionan ejemplos no limitantes de moléculas de miARN adecuadas para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1 en la Tabla 9 del Ejemplo 18.

En otras realizaciones descritas en este documento, se administran uno o más agentes que bloquean la actividad de un miARN que aborda el ARNm de PLK-1 usando un sistema de vehículo descrito en este documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido). Ejemplos de agentes de bloqueo incluyen, aunque sin limitación, oligonucleótidos de bloqueo estérico, oligonucleótidos de ácido nucleico cerrado, y morfolino oligonucleótidos. Dichos agentes de bloqueo pueden unirse directamente al miARN o al sitio de unión del miARN en el ARNm diana.

V. Sistemas de vehículo que contienen ARN interferente

Un aspecto descrito en este documento proporciona sistemas de vehículo que contienen uno o más ARN interferentes descritos en este documento, por ejemplo, ARNip, ARNia, o miARN no modificado o modificado. En algunas realizaciones, el sistema de vehículo es un sistema de vehículo basado en lípido tal como una partícula estabilizada de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP o SPLP), complejos de ácido nucleico en lípido catiónico o liposoma (es decir, lipoplexes), un liposoma, una micela, un virosoma, o una mezcla de los mismos. En otras realizaciones descritas en este documento, el sistema de vehículo es un sistema de vehículo basado en polímero tal como un complejo de polímero catiónico-ácido nucleico (es decir, poliplex). En realizaciones adicionales descritas en este documento, el sistema de vehículo es un sistema de vehículo basado en ciclodextrina tal como un complejo de polímero de ciclodextrina-ácido nucleico. En otras realizaciones descritas en este documento, el sistema de vehículo es un sistema de vehículo basado en proteína tal como un complejo de péptido catiónico-ácido nucleico. Preferiblemente, el sistema de vehículo es una partícula estabilizada de ácido nucleico-lípido tal como una SNALP o SPLP. Un especialista en la técnica apreciará que el ARN interferente descrito en este documento también puede suministrarse como una molécula desnuda.

A. Partículas estabilizadas de ácido nucleico-lípido

Las partículas estabilizadas de ácido nucleico-lípido (SNALP) descritas en este documento típicamente comprenden una molécula de ARN interferente como se describe en este documento, un lípido catiónico (por ejemplo, un lípido catiónico de Fórmula I o II), y un lípido no catiónico. La SNALP puede comprender adicionalmente un conjugado lipídico (es decir, un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas). En algunas realizaciones descritas en este documento, la SNALP puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más de las moléculas modificadas de ARN interferente descritas en este documento, solas o en combinación con al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más moléculas no modificadas de ARN interferente.

Las SNALP descritas en este documento típicamente tienen un diámetro medio de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, más típicamente de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, más típicamente de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, mucho más típicamente de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos son resistentes en solución acuosa a degradación con una nucleasa cuando están presentes en las partículas de ácido nucleico-lípido.

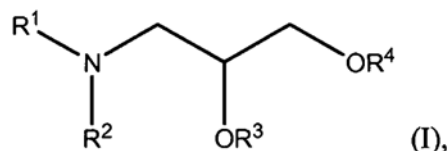
Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.753.613; 5.785.992; 5.705.385; 5.976.567; 5.981.501; 6.110.745; y 6.320.017; y la publicación PCT N° WO 96/40964.

5 1. Lípidos catiónicos

Puede usarse cualquiera de una diversidad de lípidos catiónicos en las partículas estabilizadas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento, solas o en combinación con una o más especies diferentes de lípido catiónico o especies de lípido no catiónico.

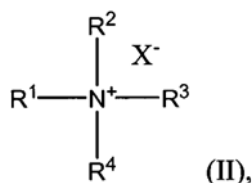
Los lípidos catiónicos que son útiles como se describe en este documento pueden ser cualquiera de varias especies de lípido que portan una carga positiva neta a pH fisiológico. Dichos lípidos incluyen, aunque sin limitación, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), dioctadecildimetilamonio (DODMA), diestearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietilamonio (DM-RIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',12'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 2,3-dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina (DLinDAP), 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), 1,2-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLinCDAP), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminoetil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-XTC2-DMA), y mezclas de los mismos. Varios de estos lípidos y análogos relacionados se han descrito en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20060083780 y 20060240554; las patentes de Estados Unidos N° 5.208.036; 5.264.618; 5.279.833; 5.283.185; 5.753.613; y 5.785.992; y la publicación PCT N° WO 96/10390. Además, están disponibles varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos y pueden usarse como se describe en este documento. Éstas incluyen, por ejemplo, LIPOFECTIN® (liposomas catiónicos disponibles en el mercado que comprenden DOTMA y DOPE, de GIBCO/BRL, Grand Island, Nueva York, EEUU); LIPOFECTAMINE® (liposomas catiónicos disponibles en el mercado que comprenden DOSPA y DOPE, de GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM® (liposomas catiónicos disponibles en el mercado que comprenden DOGS de Promega Corp., Madison, Wisconsin, EEUU).

Además, son útiles lípidos catiónicos de Fórmula I que tienen las siguientes estructuras como se describe en este documento.



donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son H o alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, R^3 y R^4 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y al menos uno de R^3 y R^4 comprende al menos dos sitios de insaturación. En ciertos casos descritos en este documento, R^3 y R^4 son ambos iguales, es decir, R^3 y R^4 son ambos linoleilo (C_{18}), etc. En otros ciertos casos descritos en este documento, R^3 y R^4 son diferentes, es decir, R^3 es tetradectrienilo (C_{14}) y R^4 es linoleilo (C_{18}). En una realización preferida descrita en este documento, el lípido catiónico de Fórmula I es simétrico, es decir, R^3 y R^4 son ambos iguales. En otra realización preferida descrita en este documento, tanto R^3 como R^4 comprenden al menos dos sitios de insaturación. En algunas realizaciones descritas en este documento, R^3 y R^4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en dodecadienilo, tetradecadienilo, hexadecadienilo, linoleilo, e icosadienilo. En una realización preferida descrita en este documento, R^3 y R^4 son ambos linoleilo. En algunas realizaciones descritas en este documento, R^3 y R^4 comprenden al menos tres sitios de insaturación y se seleccionan independientemente entre, por ejemplo, dodecatrienilo, tetradectrienilo, hexadecatrienilo, linolenilo, e icosatrienilo. En realizaciones particularmente preferidas descritas en este documento, el lípido catiónico de Fórmula I es 1,2-dilinoileilo-N,N-dimetil-aminopropano (DLinDMA) o 1,2-dilinoilenilo-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA).

Además, son útiles lípidos catiónicos de Fórmula II que tienen las siguientes estructuras como se describe en este documento.



donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son H o alquilos C_1 - C_3 , R^3 y R^4 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y al menos uno de R^3 y R^4 comprende al menos dos sitios de insaturación. En ciertos casos descritos en este documento, R^3 y R^4 son ambos iguales, es decir, R^3 y R^4 son ambos linoleilo (C_{18}), etc. En otros ciertos casos descritos en este documento, R^3 y R^4 son diferentes, es decir, R^3 es tetradectrienilo (C_{14}) y R^4 es linoleilo (C_{18}). En una realización preferida descrita en este documento, los lípidos catiónicos descritos en este documento son simétricos, es decir, R^3 y R^4 son ambos iguales. En otra realización preferida descrita en este documento, tanto R^3 como R^4 comprenden al menos dos sitios de insaturación. En algunas realizaciones descritas en este documento, R^3 y R^4 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en dodecadienilo, tetradecadienilo, hexadecadienilo, linoleilo, e icosadienilo. En una realización preferida descrita en este documento, R^3 y R^4 son ambos linoleilo. En algunas realizaciones descritas en este documento, R^3 y R^4 comprenden al menos tres sitios de insaturación y se seleccionan independientemente entre, por ejemplo, dodecatrienilo, tetradectrienilo, hexadecatrienilo, linolenilo, e icosatrienilo.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el lípido catiónico comprende de aproximadamente el 2% en mol a aproximadamente el 60% en mol, de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 50% en mol, de aproximadamente el 10% en mol a aproximadamente el 50% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 50% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 40% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol, o aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula.

En otras realizaciones descritas en este documento, el lípido catiónico comprende de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 85% en mol, de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 80% en mol, de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 75% en mol, de aproximadamente el 50% en mol a aproximadamente el 65% en mol, o de aproximadamente 55% en mol a aproximadamente el 65% en mol del lípido total presente en la partícula.

Será muy evidente para un especialista en la técnica que dependiendo del uso pretendido de las partículas, las proporciones de los componentes pueden variarse y la eficacia de suministro de una formulación particular puede medirse usando, por ejemplo, un ensayo del parámetro de liberación endosómica (ERP).

2. Lípidos no catiónicos

Los lípidos no catiónicos usados en las partículas estabilizadas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento pueden ser cualquiera de una diversidad de lípidos no cargados neutros, zwitteriónicos, o aniónicos capaces de producir un complejo estable.

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, cerebrosidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (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. También pueden usarse otros fosfolípidos diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferiblemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C_{10} - C_{24} , por ejemplo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, o oleoilo.

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

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico presente en la SNALP comprende o consiste en colesterol, por ejemplo, una SNALP libre de fosfolípido. En otras realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico presente en la SNALP comprende o consiste en uno o más fosfolípidos, por ejemplo, una SNALP libre de colesterol. En otras realizaciones, 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 su uso como se describe en este documento incluyen lípidos que no contienen fósforo tales como, por ejemplo, estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, acetil palmitato, glicerolricinoleato, hexadecil estereato, isopropil miristato, polímeros acrílicos anfotéricos, trietanolamina-lauril sulfato, amidas de ácido graso alquil-aril sulfato polietiloxilado, bromuro de dioctadecildimetil amonio, ceramida, esfingomielina, y similares.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico comprende de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 90% en mol, de aproximadamente el 10% en mol a aproximadamente el 85% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 80% en mol, aproximadamente el 10% en mol (por ejemplo, fosfolípido solamente), o aproximadamente el 60% en mol (por ejemplo, fosfolípido y colesterol) del lípido total presente en la partícula. Si está presente, el colesterol o derivado de colesterol típicamente comprende de aproximadamente el 0% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 2% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 10% en mol a aproximadamente el 60% en mol, de aproximadamente el 12% en mol a aproximadamente el 58% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 55% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 50% en mol, o aproximadamente el 48% en mol del lípido total presente en la partícula.

En otras realizaciones descritas en este documento, el lípido no catiónico comprende de aproximadamente el 13% en mol a aproximadamente el 49,5% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 25% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 35% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 20% en mol a aproximadamente el 40% en mol, de aproximadamente el 25% en mol a aproximadamente el 40% en mol, o de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, el colesterol presente en partículas libres de fosfolípido de ácido nucleico-lípido comprende de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 45% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol, de aproximadamente el 35% en mol a aproximadamente el 45% en mol, o de aproximadamente el 35% en mol a aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula libre de fosfolípido de ácido nucleico-lípido puede comprender colesterol a aproximadamente el 37% en mol del lípido total presente en la partícula.

En otras ciertas realizaciones descritas en este documento, el colesterol presente en partículas de ácido nucleico-lípido que contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol comprende de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 40% en mol, de aproximadamente el 30% en mol a aproximadamente el 35% en mol, o de aproximadamente el 35% en mol a aproximadamente el 40% en mol del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol a aproximadamente el 34% en mol del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones descritas en este documento donde las partículas de ácido nucleico-lípido contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol, el fosfolípido puede comprender de aproximadamente el 2% en mol a aproximadamente el 12% en mol, de aproximadamente el 4% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 9% en mol, o de aproximadamente el 6% en mol a aproximadamente el 8% en mol del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC a aproximadamente el 7% en mol del lípido total presente en la partícula.

3. Conjugado lipídico

Además de lípidos catiónicos y no catiónicos, las partículas estabilizadas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento pueden comprender un conjugado lipídico. El lípido conjugado es útil porque evita la agregación de partículas. Lípidos conjugados adecuados incluyen, aunque sin limitación, conjugados PEG-lípido, conjugados ATTA-lípido, conjugados polímero catiónico-lípido (CPL), y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones descritas en este documento, las partículas comprenden un conjugado PEG-lípido o un conjugado ATTA-lípido junto con un CPL.

En una realización preferida, el conjugado lipídico es un PEG-lípido. Ejemplos de PEG-lípidos incluyen, aunque sin limitación, PEG acoplado a dialquioxipropilos (PEG-DAA) como se describe en, por ejemplo, la publicación PCT N° WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) como se describe en, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20030077829 y 2005008689, PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado con ceramidas como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.885.613, PEG conjugado con colesterol o un derivado del mismo, y mezclas de los mismos. PEG-lípidos adicionales incluyen, sin limitación, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, y una mezcla de los mismos.

PEG es un polímero lineal, soluble en agua de unidades repetitivas de PEG etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 dalton, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5.000 dalton. Los PEG están disponibles en el mercado de Sigma Chemical Co. y otras compañías e incluyen, por ejemplo, los siguientes: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

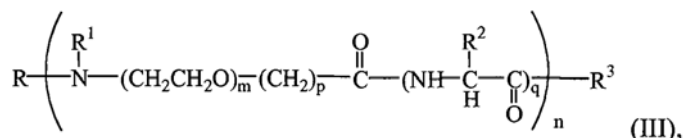
Otros PEG tales como los descritos en las patentes de Estados Unidos N° 6.774.180 y 7.053.150 (por ejemplo, mPEG (20 KDa) amina) también son útiles para preparar los conjugados PEG-lípido descritos en este documento. Además, el ácido monometoxipoli(etilenglicol)-acético (MePEG-CH₂COOH) es particularmente útil para preparar conjugados PEG-lípido incluyendo, por ejemplo, conjugados PEG-DAA.

En una realización preferida descrita en este documento, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 550 dalton a aproximadamente 10.000 dalton, más preferiblemente de aproximadamente 750 dalton a aproximadamente 5.000 dalton, más preferiblemente de aproximadamente 1.000 dalton a aproximadamente 5.000 dalton, más preferiblemente de aproximadamente 1.500 dalton a aproximadamente 3.000 dalton, e incluso más preferiblemente aproximadamente 2.000 dalton. El PEG puede estar opcionalmente sustituido por un grupo alquilo, alcoxi, acilo, o arilo. El PEG puede conjugarse directamente con el lípido o puede unirse al lípido mediante un resto enlazador. Puede usarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplar el PEG con un lípido incluyendo, por ejemplo, restos enlazadores que no contienen éster y restos enlazadores que contienen éster. En una realización preferida descrita en este documento, el resto enlazador es un resto enlazador que no contiene éster. Como se usa en este documento, el término "resto enlazador que no contiene éster" se refiere a un resto enlazador que no contiene un enlace éster carboxílico (-OC(O)-). Los restos enlazadores adecuados que no contienen éster incluyen, aunque sin limitación, amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonilo (-C(O)-), carbamato (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), disulfuro (-S-S-), éter (-O-), succinilo (-O)CCH₂CH₂C(O)-, succinamido (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), éter, disulfuro, así como combinaciones de los mismos (tal como un enlazador que contiene tanto un resto enlazador carbamato como un resto enlazador amido). En una realización preferida descrita en este documento, se usa un enlazador carbamato para acoplar el PEG al lípido.

En otras realizaciones descritas en este documento, se usa un resto enlazador que contiene éster para acoplar el PEG con el lípido. Los restos enlazadores adecuados que contienen éster incluyen, por ejemplo, carbonato (-OC(O)O-), succinoilo, ésteres fosfato (-O(O)POH-O-), ésteres sulfonato, y combinaciones de los mismos.

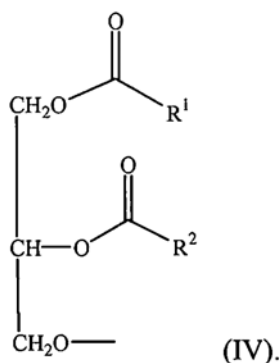
Pueden conjugarse fosfatidiletanolaminas que tienen una diversidad de grupos de cadena acilo de longitudes variables de cadena y grados de saturación con PEG para formar el conjugado lipídico. Dichas fosfatidiletanolaminas están disponibles en el mercado, o pueden aislarse o sintetizarse usando técnicas convencionales conocidas para los especialistas en la técnica. Se prefieren fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. También pueden usarse fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono- o diinsaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), y diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE).

El término "ATTA" o "poliamida" se refiere a, sin limitación, compuestos descritos en las patentes de Estados Unidos N° 6.320.017 y 6.586.559. Estos compuestos incluyen un compuesto que tiene la fórmula:

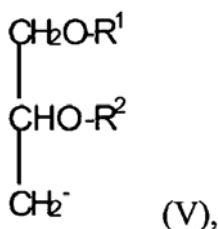


donde R es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R¹ es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; u opcionalmente, R y R¹ y el nitrógeno al que están unidos forman un resto azido; R² es un miembro del grupo seleccionado entre hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y una cadena lateral de un aminoácido; R³ es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidróxido, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR⁴R⁵, donde R⁴ y R⁵ son independientemente hidrógeno o alquilo; n es 4 a 80; m es 2 a 6; p es 1 a 4; y q es 0 ó 1. Será evidente para los especialistas en la técnica que pueden usarse otras poliamidas en los compuestos descritos en este documento.

El término "diacilglicerol" se refiere a un compuesto que tiene 2 cadenas acilo grasas, R¹ y R², ambas cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos unidos a la posición 1 y 2 de glicerol por enlaces éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o tener grados variables de insaturación. Los grupos acilo adecuados incluyen, aunque sin limitación, lauroilo (C₁₂), miristoilo (C₁₄), palmitoilo (C₁₆), estearoilo (C₁₈), e icosoilo (C₂₀). En realizaciones preferidas descritas en este documento, R¹ y R² son iguales, es decir, R¹ y R² son ambos miristoilo (es decir, dimiristoilo), R¹ y R² son ambos estearoilo (es decir, diestearoilo), etc. Los diacilglicerol tienen la siguiente fórmula general:

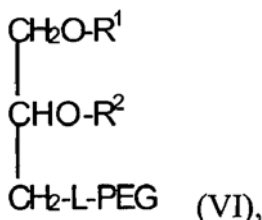


El término "dialquioxipropilo" se refiere a un compuesto que tiene 2 cadenas alquilo, R^1 y R^2 , ambas cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos. Los grupos alquilo puede estar saturados o tener grados variables de insaturación. Los dialquioxipropilos tienen la siguiente fórmula general:



donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono.

En una realización preferida, el PEG-lípido es un conjugado PEG-DAA que tiene la siguiente fórmula:



donde R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono; PEG es un polietilenglicol; y L es un resto enlazador que no contiene éster o un resto enlazador que contiene éster como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquilo de cadena larga pueden estar saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, aunque sin limitación, laurilo (C_{12}), miristilo (C_{14}), palmitilo (C_{16}), estearilo (C_{18}), e icosilo (C_{20}). En realizaciones preferidas, R^1 y R^2 son iguales, es decir, R^1 y R^2 son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R^1 y R^2 son ambos estearilo (es decir, diestearilo), etc.

En la fórmula VI anterior, el PEG tiene un peso molecular promedio que varía de aproximadamente 550 dalton a aproximadamente 10.000 dalton, más preferiblemente de aproximadamente 750 dalton a aproximadamente 5.000 dalton, más preferiblemente de aproximadamente 1.000 dalton a aproximadamente 5.000 dalton, más preferiblemente de aproximadamente 1.500 dalton a aproximadamente 3.000 dalton, e incluso más preferiblemente aproximadamente 2.000 dalton. El PEG puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, acilo, o arilo. En una realización preferida descrita en este documento, el grupo hidroxilo terminal está sustituido con un grupo metoxi o metilo.

En una realización preferida descrita en este documento, "L" es un resto enlazador que no contiene éster. Los enlazadores adecuados que no contienen éster incluyen, aunque sin limitación, un resto enlazador amido, un resto enlazador amino, un resto enlazador carbonilo, un resto enlazador carbamato, un resto enlazador urea, un resto enlazador éter, un resto enlazador disulfuro, un resto enlazador succinamidilo, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el resto enlazador que no contiene éster es un resto enlazador carbamato (es decir, un conjugado PEG-C-DAA). En otra realización preferida descrita en este documento, el resto enlazador que no contiene éster es un resto enlazador amido (es decir, un conjugado PEG-A-DAA). En otra realización preferida más descrita en este documento, el resto enlazador que no contiene éster es un resto enlazador succinamidilo (es decir, un conjugado PEG-S-DAA).

Los conjugados PEG-DAA se sintetizan usando técnicas convencionales y reactivos conocidos para los especialistas en la técnica. Se reconocerá que los conjugados PEG-DAA contendrán diversos enlaces amida, amina, éter, tio, carbamato, y urea. Los especialistas en la técnica reconocerán que los métodos y reactivos para formar estos enlaces son bien conocidos y están fácilmente disponibles. Véase, por ejemplo, March, ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY (Wiley 1992); Larock, COMPREHENSIVE ORGANIC TRANSFORMATIONS (VCH 1989); y Furniss, VOGEL'S TEXTBOOK OF PRACTICAL ORGANIC CHEMISTRY, 5ª ed. (Longman 1989). También se apreciará que cualquier grupo funcional presente puede requerir protección y desprotección en diferentes puntos en la síntesis de los conjugados PEG-DAA. Los especialistas en la técnica reconocerán que dichas técnicas son bien conocidas. Véase, por ejemplo, Green y Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991).

Preferiblemente, el conjugado PEG-DAA descrito en este documento es un conjugado dilauriloxipropilo (C₁₂)-PEG, un conjugado dimiristiloxipropilo (C₁₄)-PEG, un conjugado dipalmitiloxipropilo (C₁₆)-PEG, o un conjugado diesteariloxipropilo (C₁₈)-PEG. Los especialistas en la técnica apreciarán fácilmente que pueden usarse otros dialquiloxipropilos en los conjugados PEG-DAA descritos en este documento.

Además de lo anterior, será muy evidente para los especialistas en la técnica que pueden usarse otros polímeros hidrófilos en lugar de PEG. Ejemplos de polímeros adecuados que pueden usarse en lugar de PEG incluyen, aunque sin limitación, polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida y polidimetilacrilamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

Además de los componentes anteriores, las partículas (por ejemplo, SNALP o SPLP) descritas en este documento pueden comprender adicionalmente lípidos catiónicos de poli(etilenglicol) (PEG) o CPL (véase, por ejemplo, Chen et al., Bioconj. Chem., 11:433-437 (2000)). Las SPLP y SPLP-CPL adecuadas para su uso como se describe en este documento, y los métodos para preparar y usar SPLP y SPLP-CPL, se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos N° 6.852.334 y la publicación PCT N° WO 00/62813.

Los CPL adecuados incluyen compuestos de Fórmula VII:

A-W-Y (VII),

donde A, W, e Y son como se describe a continuación.

Con referencia a la fórmula VII, "A" es un resto lipídico tal como un lípido anfipático, un lípido neutro, o un lípido hidrófobo que actúa como anclaje lipídico. Ejemplos de lípidos adecuados incluyen, aunque sin limitación, diacilglicerolilos, dialquilglicerolilos, N-N-dialquilaminos, 1,2-diaciloxi-3-aminopropanos, y 1,2-dialquil-3-aminopropanos.

"W" es un polímero o un oligómero tal como un polímero u oligómero hidrófilo. Preferiblemente, el polímero hidrófilo es un polímero biocompatible que es no inmunogénico o posee baja inmunogenicidad inherente. Como alternativa, el polímero hidrófilo puede ser débilmente antigénico si se usa con adyuvantes apropiados. Los polímeros no inmunogénicos adecuados incluyen, aunque sin limitación, PEG, poliamidas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida descrita en este documento, el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 7.000 dalton.

"Y" es un resto policatiónico. La expresión resto policatiónico se refiere a un compuesto, derivado, o grupo funcional que tiene una carga positiva, preferiblemente al menos 2 cargas positivas a un pH seleccionado, preferiblemente pH fisiológico. Los restos policatiónicos adecuados incluyen aminoácidos básicos y sus derivados tales como arginina, asparagina, glutamina, lisina, e histidina; espermina; espermidina; dendrímeros catiónicos; poliaminas; poliamina azúcares; y amino polisacáridos. Los restos policatiónicos pueden ser lineales, tales como tetralisina lineal, ramificados o dendriméricos en estructura. Los restos policatiónicos tienen entre aproximadamente 2 a aproximadamente 15 cargas positivas, preferiblemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 12 cargas positivas, y más preferiblemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 8 cargas positivas a valores seleccionados de pH. La selección del resto policatiónico que emplear puede determinarse mediante el tipo de aplicación de la partícula que se desee.

Las cargas en los restos policatiónicos pueden estar distribuidas alrededor del resto completo de la partícula, o como alternativa, pueden ser una concentración concreta de densidad de carga en un área particular del resto de la partícula por ejemplo, una punta de carga. Si la densidad de carga está distribuida sobre la partícula, la densidad de carga puede estar distribuida de forma equitativa o distribuida de forma desigual. Todas las variaciones de distribución de carga del resto policatiónico se abarcan por la presente descripción.

El lípido "A" y el polímero no inmunogénico "W" pueden unirse mediante diversos métodos y preferiblemente por unión covalente. Pueden usarse métodos conocidos para los especialistas en la técnica para la unión covalente de "A" y "W". Enlaces adecuados incluyen, aunque sin limitación, enlaces amida, amina, carboxilo, carbonato,

carbamato, éster, e hidrazona. Será evidente para los especialistas en la técnica que "A" y "W" deben tener grupos funcionales complementarios para efectuar el enlace. La reacción de estos dos grupos, uno en el lípido y el otro en el polímero, proporcionará el enlace deseado. Por ejemplo, cuando el lípido es un diacilglicerol y el hidroxilo terminal está activado, por ejemplo con NHS y DCC, para formar un éster activo, y después se hace reaccionar con un polímero que contiene un grupo amino, tal como con una poliamida (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 6.320.017 y 6.586.559), se formará un enlace amida entre los dos grupos.

En ciertos casos descritos en este documento, el resto policatiónico puede tener un ligando unido, tal como un ligando de direccionamiento o un resto quelante para formar complejos con calcio. Preferiblemente, después de unir el ligando, el resto catiónico mantiene una carga positiva. En ciertos casos descritos en este documento, el ligando que se une tiene una carga positiva. Ligandos adecuados incluyen, aunque sin limitación, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluyen lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos vehículo, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos analíticamente detectables, compuestos terapéuticamente activos, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, inmunoestimuladores, radiomarcadores, fluorógenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otros restos de direccionamiento, o toxinas.

En algunas realizaciones descritas en este documento, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido) comprende de aproximadamente el 0% en mol a aproximadamente el 20% en mol, de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 20% en mol, de aproximadamente el 1,5% en mol a aproximadamente el 18% en mol, de aproximadamente el 4% en mol a aproximadamente el 15% en mol, de aproximadamente el 5% en mol a aproximadamente el 12% en mol, o aproximadamente el 2% en mol del lípido total presente en la partícula.

En otras realizaciones descritas en este documento, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido) comprende de aproximadamente el 0,1% en mol a aproximadamente el 10% en mol, de aproximadamente el 0,1% en mol a aproximadamente el 5% en mol, de aproximadamente el 0,2% en mol a aproximadamente el 5% en mol, de aproximadamente el 0,3% en mol a aproximadamente el 5% en mol, de aproximadamente el 0,4% en mol a aproximadamente el 5% en mol, de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 5% en mol, de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 2% en mol, de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 1,5% en mol, de aproximadamente el 0,5% en mol a aproximadamente el 1% en mol, de aproximadamente el 1% en mol a aproximadamente el 2% en mol, o aproximadamente el 1,5% en mol del lípido total presente en la partícula.

Un especialista en la técnica apreciará que la concentración del conjugado lipídico puede variarse dependiendo del conjugado lipídico empleado y la tasa a la cual la partícula de ácido nucleico-lípido tiene que llegar a ser fusogénica.

Controlando la composición y concentración del conjugado lipídico, se puede controlar la tasa a la cual el conjugado lipídico se intercambia de la partícula de ácido nucleico-lípido y, a su vez, la tasa a la cual la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica. Por ejemplo, cuando se usa un conjugado PEG-fosfatidiletanolamina o PEG-ceramida como conjugado lipídico, la tasa a la cual la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica puede variarse, por ejemplo, variando la concentración del conjugado lipídico, variando el peso molecular del PEG, o variando la longitud de cadena y grado de saturación de los grupos de cadena acilo en la fosfatidiletanolamina o la ceramida. Además, pueden usarse otras variables incluyendo, por ejemplo, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. para variar y/o controlar la tasa a la cual la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica. Otros métodos que pueden usarse para controlar la tasa a la cual la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica serán evidentes para los especialistas en la técnica tras leer esta descripción.

B. Sistemas adicionales de vehículo

Ejemplos no limitantes de sistemas adicionales de vehículo basados en lípido adecuados para usar como se describe en este documento incluyen lipoplexes (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030203865; y Zhang et al., J. Control Release, 100:165-180 (2004)), lipoplexes sensibles a pH (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20020192275), lipoplexes enmascarados de forma inversa (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20030180950), composiciones basadas en lípido catiónico (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.756.054; y la publicación de patente de Estados Unidos N° 20050234232), liposomas catiónicos (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20030229040, 20020160038, y 20020012998; la patente de Estados Unidos N° 5.908.635; y la publicación PCT N° WO 01/72283), liposomas aniónicos (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030026831), liposomas sensibles a pH (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20020192274; y el documento AU 2003210303), liposomas recubiertos con anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030108597; y la publicación PCT N° WO 00/50008), liposomas específicos de tipo celular (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030198664), liposomas que contienen ácido nucleico y péptidos (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.207.456), liposomas que contienen lípidos derivatizados con polímeros hidrófilos liberables (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030031704), ácido nucleico atrapado en lípido (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N° WO 03/057190 y WO 03/059322), ácido nucleico encapsulado en lípido

(véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030129221; y la patente de Estados Unidos N° 5.756.122), otras composiciones liposómicas (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20030035829 y 20030072794; y la patente de Estados Unidos N° 6.200.599), mezclas estabilizadas de liposomas y emulsiones (véase, por ejemplo, el documento EP1304160), composiciones en emulsión (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.747.014), y micro-emulsiones de ácido nucleico (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20050037086).

Ejemplos de sistemas de vehículo basados en polímero adecuados para usar como se describe en este documento incluyen, aunque sin limitación, complejos de polímero catiónico-ácido nucleico (es decir, poliplexes). Para formar un poliplex, típicamente se forma un complejo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) con un polímero catiónico que tiene una estructura polimérica lineal, ramificada, en estrella, o dendrítica que condensa el ácido nucleico en partículas cargadas positivamente capaces de interactuar con proteoglicanos aniónicos en la superficie celular y entrar en las células por endocitosis. En algunas realizaciones descritas en este documento, el poliplex comprende ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) en complejo con un polímero catiónico tal como polietilénimina (PEI) (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.013.240; disponible en el mercado de Qbiogene, Inc. (Carlsbad, CA) como *In vivo* jetPEI™, una forma lineal de PEI), poli-propilénimina (PPI), polivinilpirrolidona (PVP), poli-L-lisina (PLL), dietilaminoetil (DEAE)-dextrano, polímeros de poli(β-amino éster) (PAE) (véase, por ejemplo, Lynn et al., J. Am. Chem. Soc., 123:8155-8156 (2001)), quitosana, poliamidoamina (PAMAM) dendrímeros (véase, por ejemplo, Kukowska-Latallo et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:4897-4902 (1996)), porfirina (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.620.805), poliviniléter (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040156909), amidinio policíclico (véase, por ejemplo, la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030220289), otros polímeros que comprenden grupos amina primaria, imina, guanidina, y/o imidazol (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 6.013.240; la publicación PCT N° WO/9602655; la publicación PCT N° WO95/21931; Zhang et al., J. Control Release, 100:165-180 (2004); y Tiera et al., Curr. Gene Ther., 6:59-71 (2006)), y una mezcla de los mismos. En otras realizaciones descritas en este documento, el poliplex comprende complejos de polímero catiónico-ácido nucleico como se describe en las publicaciones de patente de Estados Unidos N° 20060211643, 20050222064, 20030125281, y 20030185890, y la publicación PCT N° WO 03/066069; complejos de polímero biodegradable poli(β-amino éster)-ácido nucleico como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040071654; micropartículas que contienen matrices poliméricas como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040142475; otras composiciones de micropartículas como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030157030; complejos de ácido nucleico condensado como se describe en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20050123600; y composiciones de nanocápsulas y microcápsulas como se describe en el documento AU 2002358514 y la publicación PCT N° WO 02/096551.

En ciertos casos descritos en este documento, el ARN interferente puede formar complejos con ciclodextrina o un polímero de la misma. Ejemplos no limitantes de sistemas de vehículo basados en ciclodextrina incluyen los complejos de polímero modificado con ciclodextrina-ácido nucleico descritos en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040087024; los complejos de copolímero lineal de ciclodextrina-ácido nucleico descritos en las patentes de Estados Unidos N° 6.509.323, 6.884.789, y 7.091.192; y los complejos de polímero de ciclodextrina-agente de formación de complejos-ácido nucleico descritos en la patente de Estados Unidos N° 7.018.609. En otros ciertos casos descritos en este documento, el ARN interferente puede formar complejos con un péptido o polipéptido. Un ejemplo de un sistema de vehículo basado en proteína incluye, aunque sin limitación, el complejo de oligopéptido catiónico-ácido nucleico descrito en la publicación PCT N° WO95/21931.

VI. Preparación de partículas de ácido nucleico-lípido

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero descritas en este documento, en que el ARN interferente descrito en este documento está encapsulado en una bicapa lipídica y está protegido de la degradación, pueden formarse por cualquier método conocido en la técnica incluyendo, aunque sin limitación, un método de mezcla continua, un proceso de dilución directa, un método de diálisis en detergente, o una modificación de un método en fase inversa que utiliza disolventes orgánicos para proporcionar una única fase durante la mezcla de los componentes.

En realizaciones preferidas descritas en este documento, los lípidos catiónicos son lípidos de Fórmula I y II o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones preferidas descritas en este documento, los lípidos no catiónicos son esfingomielina de huevo (ESM), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, 14:0 PE (1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE)), 16:0 PE (1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE)), 18:0 PE (1,2-diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE)), 18:1 PE (1,2-dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE)), 18:1 trans PE (1,2-dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE)), polímeros basados en polietilenglicol (por ejemplo, PEG 2000, PEG 5000, diacilglicerol modificados con PEG, o dialquiloxypropilos modificados con PEG), colesterol, o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones preferidas más descritas en este documento, los disolventes orgánicos son metanol, cloroformo, cloruro de metileno, etanol, éter dietílico, o combinaciones de los mismos.

Una realización preferida descrita en este documento proporciona partículas de ácido nucleico-lípido producidas mediante un método de mezcla continua, por ejemplo, proceso que incluye proporcionar una solución acuosa que comprende un ácido nucleico tal como un ARN interferente en un primer depósito, proporcionar una solución de lípido orgánico en un segundo depósito, y mezclar la solución acuosa con la solución de lípido orgánico de modo que la solución de lípido orgánico se mezcle con la solución acuosa para producir de forma sustancialmente instantánea un liposoma que encapsule el ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente). Este proceso y el aparato para realizar este proceso se describen en detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20040142025.

La acción de introducir continuamente soluciones de lípido y tampón en un entorno de mezcla, tal como en una cámara de mezcla, causa una dilución continua de la solución de lípido con la solución de tampón, produciendo de ese modo un liposoma de forma sustancialmente instantánea tras la mezcla. Como se usa en este documento, la expresión "dilución continua de una solución de lípido con una solución de tampón" (y variaciones) generalmente significa que la solución de lípido se diluye de forma suficientemente rápida en un proceso de hidratación con fuerza suficiente para efectuar la generación de vesículas. Mezclando la solución acuosa que comprende un ácido nucleico con la solución de lípido orgánico, la solución de lípido orgánico experimenta una dilución continua por etapas en presencia de la solución de tampón (es decir, solución acuosa) para producir una partícula de ácido nucleico-lípido.

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero formadas usando el método de mezcla continua típicamente tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se agregan y se dimensionan opcionalmente para conseguir un tamaño de partícula uniforme.

Otra realización descrita en este documento proporciona partículas de ácido nucleico-lípido producidas mediante un proceso de dilución directa que incluye formar una solución de liposoma e introducir inmediata y directamente la solución de liposoma en un vaso de recogida que contiene una cantidad controlada de tampón de dilución. En aspectos preferidos descritos en este documento, el vaso de recogida incluye uno o más elementos configurados para agitar los contenidos del vaso de recogida para facilitar la dilución. En un aspecto descrito en este documento, la cantidad de tampón de dilución presente en el vaso de recogida es sustancialmente igual al volumen de solución de liposoma introducido al mismo. Como ejemplo no limitante, una solución de liposoma en etanol al 45% cuando se introduce en el vaso de recogida que contiene un volumen igual de tampón de dilución producirá ventajosamente partículas más pequeñas.

Otra realización más descrita en este documento proporciona partículas de ácido nucleico-lípido producidas mediante un proceso de dilución directa en que un tercer depósito que contiene tampón de dilución está acoplado de forma fluida a una segunda región de mezcla. En esta realización descrita en este documento, la solución de liposoma formada en una primera región de mezcla se mezcla inmediata y directamente con tampón de dilución en la segunda región de mezcla. En aspectos preferidos descritos en este documento, la segunda región de mezcla incluye un conector en T dispuesto para que los flujos de solución de liposoma y tampón de dilución se reúnan como flujos opuestos a 180°; sin embargo, pueden usarse conectores que contengan ángulos más llanos, por ejemplo, de aproximadamente 27° a aproximadamente 180°. Un mecanismo de bombeo suministra un flujo controlable de tampón a la segunda región de mezcla. En un aspecto descrito en este documento, el caudal de tampón de dilución proporcionado a la segunda región de mezcla se controla para que sea sustancialmente igual al caudal de solución de liposoma introducido a la misma desde la primera región de mezcla. Esta realización descrita en este documento permite ventajosamente más control del flujo de tampón de dilución en mezcla con la solución de liposoma en la segunda región de mezcla, y por lo tanto también la concentración de solución de liposoma en tampón en todo el segundo proceso de mezcla. Dicho control del caudal de tampón de dilución permite ventajosamente la formación de tamaño pequeño de partícula a concentraciones reducidas.

Estos procesos y los aparatos para realizar estos procesos de dilución directa se describen en detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20070042031.

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero formadas usando el proceso de dilución directa típicamente tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se agregan y se dimensionan opcionalmente para conseguir un tamaño de partícula uniforme.

En algunas realizaciones descritas en este documento, las partículas se forman usando diálisis en detergente. Sin la pretensión de limitarse a ningún mecanismo particular de formación, se pone en contacto un ácido nucleico tal como un ARN interferente con una solución detergente de lípidos catiónicos para formar un complejo de ácido nucleico recubierto. Estos ácidos nucleicos recubiertos pueden agregarse y precipitar. Sin embargo, la presencia de un detergente reduce esta agregación y permite que los ácidos nucleicos recubiertos reaccionen con el exceso de lípidos (típicamente, lípidos no catiónicos) para formar partículas en que el ácido nucleico está encapsulado en una bicapa lipídica. Por tanto, las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero pueden prepararse del siguiente modo:

- (a) se combina un ácido nucleico con lípidos catiónicos en una solución detergente para formar un complejo recubierto de ácido nucleico-lípido;
 (b) se ponen en contacto lípidos no catiónicos con el complejo recubierto de ácido nucleico-lípido para formar una solución detergente que comprende un complejo de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos; y
 (c) se dializa la solución detergente de la etapa (b) para proporcionar una solución de partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero, donde el ácido nucleico está encapsulado en una bicapa lipídica y las partículas son estables en suero y tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm.

Se forma una solución inicial de complejos recubiertos de ácido nucleico-lípido combinando el ácido nucleico con los lípidos catiónicos en una solución detergente. En estas realizaciones descritas en este documento, la solución detergente es preferiblemente una solución acuosa de un detergente neutro que tiene una concentración crítica de micelas de 15-300 mM, más preferiblemente 20-50 mM. Ejemplos de detergentes adecuados incluyen, por ejemplo, N,N'-((octanoilimino)-bis-(trimetileno))-bis-(D-gluconamida) (BIGCHAP); BRIJ 35; Desoxi-BIGCHAP; dodecylpoli(etilenglicol) éter; Tween 20; Tween 40; Tween 60; Tween 80; Tween 85; Mega 8; Mega 9; Zwittergent® 3-08; Zwittergent® 3-10; Triton X-405; hexil-, heptil-, octil- y nonil-β-D-glucopiranosido; y heptiltiogluconopiranosido; siendo octil β-D-glucopiranosido y Tween-20 los más preferidos. La concentración de detergente en la solución detergente es típicamente aproximadamente 100 mM a aproximadamente 2 M, preferiblemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 1,5 M.

Los lípidos catiónicos y ácidos nucleicos típicamente se combinarán para producir una proporción de carga (+/-) de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1, en una proporción de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 12:1, o en una proporción de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 6:1. Además, la concentración global de ácido nucleico en solución será típicamente de aproximadamente 25 µg/ml a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 25 µg/ml a aproximadamente 200 µg/ml, o de aproximadamente 50 µg/ml a aproximadamente 100 µg/ml. La combinación de ácidos nucleicos y lípidos catiónicos en solución detergente se mantiene, típicamente a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo que es suficiente para que se formen complejos recubiertos. Como alternativa, los ácidos nucleicos y lípidos catiónicos puede combinarse en la solución detergente y calentarse hasta temperaturas de hasta aproximadamente 37°C, aproximadamente 50°C, aproximadamente 60°C, o aproximadamente 70°C. Para ácidos nucleicos que son particularmente sensibles a la temperatura, los complejos recubiertos puede formarse a temperaturas inferiores, típicamente disminuida hasta aproximadamente 4°C.

La solución detergente de los complejos recubiertos de ácido nucleico-lípido después se pone en contacto con lípidos no catiónicos para proporcionar una solución detergente de complejos de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos. Los lípidos no catiónicos que son útiles en esta etapa incluyen, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, cardiolipina, y cerebrósidos. En realizaciones preferidas descritas en este documento, los lípidos no catiónicos son diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, o esfingomielina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferiblemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C₁₀-C₂₄. Más preferiblemente, los grupos acilo son lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, u oleoilo. En realizaciones particularmente preferidas descritas en este documento, los lípidos no catiónicos son DSPC, DOPE, POPC, fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol, o una mezcla de los mismos. En las realizaciones más preferidas, las partículas de ácido nucleico-lípido son partículas fusogénicas con propiedades potenciadas *in vivo* y el lípido no catiónico es DSPC o DOPE. Además, las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento pueden comprender adicionalmente colesterol. En otras realizaciones preferidas descritas en este documento, los lípidos no catiónicos pueden comprender adicionalmente polímeros basados en polietilenglicol tales como PEG 2.000, PEG 5.000, y PEG conjugado con un diacilglicerol, una ceramida, o un fosfolípido, como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos Nº 5.820.873 y la publicación de patente de Estados Unidos Nº 20030077829. En realizaciones preferidas adicionales descritas en este documento, los lípidos no catiónicos pueden comprender adicionalmente polímeros basados en polietilenglicol tales como PEG 2.000, PEG 5.000, y PEG conjugado con un dialquilohipropilo.

La cantidad de lípido no catiónico que se usa en los presentes métodos es típicamente de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 mg de lípidos totales para 50 µg de ácido nucleico. Preferiblemente, la cantidad de lípido total es de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg por 50 µg de ácido nucleico.

Después de la formación de la solución detergente de complejos de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos, el detergente se retira, preferiblemente por diálisis. La retirada del detergente provoca la formación de una bicapa lipídica que rodea el ácido nucleico proporcionando partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero que tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se agregan y se dimensionan opcionalmente para conseguir un tamaño de partícula uniforme.

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero puede dimensionarse por cualquiera de los métodos disponibles para dimensionar liposomas. El dimensionado puede realizarse para conseguir un intervalo deseado de tamaño y una distribución relativamente estrecha de tamaños de partícula.

Están disponibles varias técnicas para dimensionar las partículas a un tamaño deseado. Un método de dimensionado, usado para liposomas e igualmente aplicable a las presentes partículas, se describe en la patente de Estados Unidos N° 4.737.323. La sonicación de una suspensión de partículas por sonicación en baño o con sonda produce una reducción progresiva de tamaño hasta partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La

homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar partículas más grandes en más pequeñas. En un procedimiento típico de homogeneización, las partículas se reciclan a través de un homogeneizador convencional de emulsión hasta que se observan tamaños seleccionados de partícula, típicamente entre aproximadamente 60 y aproximadamente 80 nm. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula puede controlarse por discriminación de tamaños de partícula con haz láser convencional, o QELS.

La extrusión de las partículas a través de una membrana de policarbonato de pequeño poro o una membrana cerámica asimétrica también es un método eficaz para reducir tamaños de partícula hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se recicla a través de la membrana una o más veces hasta que se consigue la distribución deseada de tamaño de partícula. Las partículas pueden extruirse a través de membranas de poro sucesivamente más pequeño, para conseguir una reducción gradual en el tamaño.

En otro grupo de realizaciones descritas en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero pueden prepararse del siguiente modo:

- (a) se prepara una mezcla que comprende lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos en un disolvente orgánico;
- (b) se pone en contacto una solución acuosa de ácido nucleico con la mezcla de la etapa (a) para proporcionar una única fase obvia; y
- (c) se retira el disolvente orgánico para proporcionar una suspensión de partículas de ácido nucleico-lípido, donde el ácido nucleico está encapsulado en una bicapa lipídica y las partículas son estables en suero y tienen un tamaño de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm.

Los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente), lípidos catiónicos, y lípidos no catiónicos que son útiles en este grupo de realizaciones son los descritos para los métodos anteriores de diálisis en detergente.

La selección de un disolvente orgánico típicamente implicará la consideración de la polaridad del disolvente y la facilidad con que el disolvente pueda retirarse en las fases posteriores de la formación de partículas. El disolvente orgánico, que también se usa como agente de solubilización, está en una cantidad suficiente para proporcionar una mezcla en única fase obvia de ácido nucleico y lípidos. Los disolventes adecuados incluyen, aunque sin limitación, cloroformo, diclorometano, éter dietílico, ciclohexano, ciclopentano, benceno, tolueno, metanol, u otros alcoholes alifáticos tales como propanol, isopropanol, butanol, terc-butanol, iso-butanol, pentanol y hexanol. También pueden usarse combinaciones de dos o más disolventes como se describe en este documento.

El contacto del ácido nucleico con la solución orgánica de lípidos catiónicos y no catiónicos se consigue mezclando juntas una primera solución de ácido nucleico, que es típicamente una solución acuosa, y una segunda solución orgánica de los lípidos. Un especialista en la técnica entenderá que esta mezcla puede tener lugar mediante cualquiera de varios métodos, por ejemplo, por medios mecánicos tales como mediante el uso de mezcladores con vórtice.

Después de haber puesto en contacto el ácido nucleico con la solución orgánica de lípidos, el disolvente orgánico se retira, formando de este modo una suspensión acuosa de partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero. Los métodos usados para retirar el disolvente orgánico típicamente implicarán evaporación a presión reducida o soplado de una corriente de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) a través de la mezcla.

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero así formadas típicamente tendrán tamaños de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Para conseguir una reducción adicional de tamaño u homogeneidad de tamaño en las partículas, puede realizarse dimensionado como se ha descrito anteriormente.

En otras realizaciones descritas en este documento, los métodos comprenderán adicionalmente añadir policationes no lipídicas que son útiles para realizar el suministro a células usando las presentes composiciones. Ejemplos de policationes no lipídicas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, bromuro de hexadimetrina (vendida con la marca registrada POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EEUU) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina, y polietilenoimina.

En ciertas realizaciones descritas en este documento, la formación de las partículas de ácido nucleico-lípido puede realizarse en un sistema mono-fase (por ejemplo, una monofase Bligh y Dyer o mezcla similar de disolventes acuosos y orgánicos) o en un sistema de dos fases con mezcla adecuada.

Cuando la formación de los complejos se realiza en un sistema mono-fase, los lípidos catiónicos y los ácidos nucleicos se disuelven cada uno en un volumen de la mezcla en mono-fase. La combinación de las dos soluciones proporciona una única mezcla en que se forman los complejos. Como alternativa, los complejos pueden formarse en mezclas de dos fases en que los lípidos catiónicos se unen al ácido nucleico (que está presente en la fase acuosa), y lo "empujan" a la fase orgánica.

En otra realización descrita en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero pueden prepararse del siguiente modo:

- (a) se ponen en contacto los ácidos nucleicos con una solución que comprende lípidos no catiónicos y un detergente para formar una mezcla de ácido nucleico-lípido;
- (b) se ponen en contacto los lípidos catiónicos con la mezcla de ácido nucleico-lípido para neutralizar una parte de la carga negativa de los ácidos nucleicos y formar una mezcla de ácidos nucleicos de carga neutralizada y lípidos; y
- (c) se retira el detergente de la mezcla de carga neutralizada para proporcionar las partículas de ácido nucleico-lípido en que los ácidos nucleicos están protegidos de la degradación.

En un grupo de realizaciones descritas en este documento, la solución de lípidos no catiónicos y detergente es una solución acuosa. El contacto de los ácidos nucleicos con la solución de lípidos no catiónicos y detergente se consigue típicamente mezclando juntas una primera solución de ácidos nucleicos y una segunda solución de los lípidos y detergente. Un especialista en la técnica entenderá que esta mezcla puede tener lugar por cualquiera de varios métodos, por ejemplo, por medios mecánicos tales como mediante el uso de mezcladores con vórtice. Preferiblemente, la solución de ácido nucleico también es una solución detergente. La cantidad de lípido no catiónico que se usa en el presente método se determina típicamente en base a la cantidad de lípido catiónico usada, y es típicamente de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 5 veces la cantidad de lípido catiónico, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 veces la cantidad de lípido catiónico usada.

En algunas realizaciones descritas en este documento, los ácidos nucleicos se precondensan como se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 09/744.103.

La mezcla de ácido nucleico-lípido así formada se pone en contacto con lípidos catiónicos para neutralizar una parte de la carga negativa que está asociada con los ácidos nucleicos (u otros materiales polianiónico) presentes. La cantidad de lípidos catiónicos usada típicamente será suficiente para neutralizar al menos el 50% de la carga negativa del ácido nucleico. Preferiblemente, la carga negativa estará al menos un 70% neutralizada, más preferiblemente al menos un 90% neutralizada. Los lípidos catiónicos que son útiles como se describe en este documento, incluyen, por ejemplo, DLinDMA y DLenDMA. Estos lípidos y análogos relacionados se describen en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20060083780.

El contacto de los lípidos catiónicos con la mezcla de ácido nucleico-lípido puede realizarse por cualquiera de varias técnicas, preferiblemente mezclando juntas una solución del lípido catiónico y una solución que contiene la mezcla de ácido nucleico-lípido. Tras la mezcla de las dos soluciones (o el contacto de cualquier otra manera), una parte de la carga negativa asociada con el ácido nucleico se neutraliza. No obstante, el ácido nucleico permanece en un estado no condensado y adquiere características hidrófilas.

Después de haber puesto en contacto los lípidos catiónicos con la mezcla de ácido nucleico-lípido, se retira el detergente (o la combinación de detergente y disolvente orgánico), formando de este modo las partículas de ácido nucleico-lípido. Los métodos usados para retirar el detergente típicamente implicarán diálisis. Cuando están presentes disolventes orgánicos, la retirada se consigue típicamente por evaporación a presión reducida o por soplado de una corriente de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) a través de la mezcla.

Las partículas así formadas típicamente tendrán un tamaño de aproximadamente 50 nm a varios micrómetros, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm. Para conseguir una reducción adicional de tamaño u homogeneidad de tamaño en las partículas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden sonicarse, filtrarse, o someterse a otras técnicas de dimensionado que se usan en formulaciones liposómicas y son conocidas para los especialistas en la técnica.

En otras realizaciones descritas en este documento, los métodos comprenderán adicionalmente añadir policationes no lipídicas que son útiles para realizar la lipofección de células usando las presentes composiciones. Ejemplos de policationes no lipídicas adecuados incluyen, bromuro de hexadimetrina (vendido con la marca registrada POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EEUU) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina, y polietilenoimina. La adición de estas sales es preferiblemente después de haberse formado las partículas.

En otro aspecto descrito en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero pueden prepararse del siguiente modo:

- (a) se pone en contacto una cantidad de lípidos catiónicos con ácidos nucleicos en una solución; comprendiendo la solución aproximadamente el 15%-35% de agua y aproximadamente el 65%-85% de disolvente orgánico y siendo la cantidad de lípidos catiónicos suficiente para producir una proporción de carga +/- de aproximadamente 0,85 a aproximadamente 2,0, para proporcionar un complejo hidrófobo de ácido nucleico-lípido;
- (b) se pone en contacto el complejo hidrófobo de ácido nucleico-lípido en solución con lípidos no catiónicos, para proporcionar una mezcla de ácido nucleico-lípido; y
- (c) se retiran los disolventes orgánicos de la mezcla de ácido nucleico-lípido para proporcionar partículas de ácido nucleico-lípido en que los ácidos nucleicos están protegidos de la degradación.

Los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente), lípidos no catiónicos, lípidos catiónicos, y disolventes orgánicos que son útiles en este aspecto descrito en este documento son los mismos que los descritos para los métodos anteriores que usaban detergentes. En un grupo de realizaciones, la solución de la etapa (a) es una monofase. En otro grupo de realizaciones descritas en este documento, la solución de la etapa (a) es de dos fases.

En realizaciones preferidas descritas en este documento, los lípidos no catiónicos son ESM, DSPC, DOPC, POPC, DPPC, monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, DMPE, DPPE, DSPE, DOPE, DEPE, SOPE, POPE, polímeros basados en PEG (por ejemplo, PEG 2000, PEG 5000, diacilglicérol modificados con PEG, o dialquiloipropilos modificados con PEG), colesterol, o combinaciones de los mismos. En otras realizaciones preferidas más descritas en este documento, los disolventes orgánicos son metanol, cloroformo, cloruro de metileno, etanol, éter dietílico o combinaciones de los mismos.

En una realización descrita en este documento, el ácido nucleico es un ARN interferente como se describe en este documento; el lípido catiónico es DLindMA, DLenDMA, DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS, o combinaciones de los mismos; el lípido no catiónico es ESM, DOPE, PEG-DAG, DSPC, DPPC, DPPE, DMPE, monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, DSPE, DEPE, SOPE, POPE, colesterol, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, DSPC y PEG-DAA); y el disolvente orgánico es metanol, cloroformo, cloruro de metileno, etanol, éter dietílico o combinaciones de los mismos.

Como anteriormente, el contacto de los ácidos nucleicos con los lípidos catiónicos se consigue típicamente mezclando juntas una primera solución de ácidos nucleicos y una segunda solución de los lípidos, preferiblemente por medios mecánicos tal como usando mezcladores con vórtice. La mezcla resultante contiene complejos como se ha descrito anteriormente. Estos complejos después se convierten en partículas mediante la adición de lípidos no catiónicos y la retirada del disolvente orgánico. La adición de los lípidos no catiónicos se consigue típicamente añadiendo simplemente una solución de los lípidos no catiónicos a la mezcla que contiene los complejos. También puede usarse una adición inversa. La posterior retirada de los disolventes orgánicos puede realizarse por métodos conocidos para los especialistas en la técnica y también descritos anteriormente.

La cantidad de lípidos no catiónicos que se usa en este aspecto descrito en este documento es típicamente una cantidad de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 15 veces la cantidad (en una base molar) de lípidos catiónicos que se usó para proporcionar el complejo de ácido nucleico de carga neutralizada-lípido. Preferiblemente, la cantidad es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 9 veces la cantidad de lípidos catiónicos usada.

En una realización descrita en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido preparadas de acuerdo con los métodos descritos anteriormente son de carga neta neutra o portan una carga global que proporciona a las partículas mayor actividad de lipofección génica. Preferiblemente, el componente de ácido nucleico de las partículas es un ácido nucleico que interfiere con la producción de una proteína indeseada. En otras realizaciones preferidas descritas en este documento, el lípido no catiónico puede comprender adicionalmente colesterol.

En algunas realizaciones descritas en este documento, las proporciones de ácido nucleico a lípido (proporciones masa/masa) en una partícula de ácido nucleico-lípido formada variarán de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08. La proporción de los materiales de partida también está dentro de este rango. En otras realizaciones descritas en este documento, la preparación de partícula de ácido nucleico-lípido usa aproximadamente 400 µg de ácido nucleico por 10 mg de lípido total o una proporción másica de ácido nucleico a lípido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08 y, más preferiblemente, aproximadamente 0,04, que corresponde a 1,25 mg de lípido total por 50 µg de ácido nucleico. En otras realizaciones preferidas descritas en este documento, la partícula tiene una proporción másica ácido nucleico:lípido de aproximadamente 0,08.

En otras realizaciones descritas en este documento, las proporciones de lípido a ácido nucleico (proporciones masa/masa) en una partícula de ácido nucleico-lípido formada variarán de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente

3 (3:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 20 (20:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 15 (15:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 10 (10:1), aproximadamente 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), o 15 (15:1). La proporción de los materiales de partida también está dentro de este intervalo.

Como se ha analizado previamente, el lípido conjugado puede incluir adicionalmente un CPL. Se analiza en este documento una diversidad de métodos generales para preparar SNALP-CPL (SNALP que contienen CPL). Dos técnicas generales incluyen la técnica "post-inserción", es decir, la inserción de un CPL en, por ejemplo, una SNALP pre-formada, y la técnica "convencional", donde el CPL se incluye en la mezcla de lípidos durante, por ejemplo, las etapas de formación de SNALP. La técnica de post-inserción produce SNALP que tienen CPL principalmente en la cara externa de la membrana de bicapa de la SNALP, mientras que las técnicas convencionales proporcionan SNALP que tienen CPL en ambas caras interna y externa. El método es especialmente útil para vesículas preparadas a partir de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAA y PEG-DAG). Los métodos para preparar SNALP-CPL, se muestran, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.705.385; 6.586.410; 5.981.501; 6.534.484; y 6.852.334; la publicación de patente de Estados Unidos N° 20020072121; y la publicación PCT N° WO 00/62813.

VII. Kits

También se describen en este documento partículas de ácido nucleico-lípido en forma de kit. El kit puede comprender un recipiente que está compartimentado para alojar los diversos elementos de las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, los ácidos nucleicos y los componentes lipídicos individuales de las partículas). En algunas realizaciones descritas en este documento, el kit puede comprender adicionalmente un desestabilizante de membrana endosómica (por ejemplo, iones calcio). El kit típicamente contiene las composiciones de partícula de ácido nucleico-lípido descritas en este documento, preferiblemente en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación y administración.

Como se explica en este documento, las SNALP descritas en este documento puede adaptarse para abordar preferentemente tejidos u órganos particulares de interés. El direccionamiento preferente de SNALP se realiza controlando la composición de la propia SNALP. Por ejemplo, como se expone en los Ejemplos 14 y 15, se ha descubierto que la formulación de SNALP 1:57 PEG-cDSA puede usarse para abordar preferentemente tumores fuera del hígado, mientras que la formulación de SNALP 1:57 PEG-cDMA puede usarse para abordar preferentemente el hígado. En ciertos casos descritos en este documento, sin embargo, puede ser deseable tener un resto de direccionamiento unido a la superficie de la partícula para potenciar adicionalmente el direccionamiento de la SNALP. Los métodos para unir restos de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos, proteínas) a lípidos (tales como los usados en las presentes partículas) son conocidos para los especialistas en la técnica.

VIII. Administración de partículas de ácido nucleico-lípido

Una vez formadas, las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero (SNALP) descritas en este documento son útiles para la introducción de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente) en células. Por consiguiente, la descripción de este documento también proporciona métodos para introducir un ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) en una célula. Los métodos se realizan *in vitro* o *in vivo* formando primero las partículas como se ha descrito anteriormente y después poniendo en contacto las partículas con las células durante un periodo de tiempo suficiente para que sucede el suministro del ácido nucleico a las células.

Las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento pueden adsorberse a casi cualquier tipo celular con que se mezclan o contactan. Una vez adsorbidas, las partículas pueden endocitarse por una parte de las células, intercambiar lípidos con membranas celulares, o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la parte de ácido nucleico de la partícula puede tener lugar mediante una cualquiera de estas vías. En particular, cuando tiene lugar la fusión, la membrana de la partícula se integra en la membrana celular y los contenidos de la partícula se combinan con el fluido intracelular.

Las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento pueden administrarse solas o en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina fisiológica o tampón fosfato) seleccionado de acuerdo con la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional. Generalmente, se empleará solución salina tamponada normal (por ejemplo, NaCl 135-150 mM) como vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, y similares, incluyendo glucoproteínas para estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Se describen vehículos adecuados adicionales en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17ª ed. (1985). Como se usa en este documento, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes,

agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, tampones, soluciones de vehículo, suspensiones, coloides, y similares. La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano.

5 El vehículo farmacéuticamente aceptable generalmente se añade después de la formación de las partículas. Por tanto, después de formar la partícula, la partícula puede diluirse en vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina tamponada normal.

10 La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente el 0,05%, habitualmente al o al menos aproximadamente al 2 al 5%, hasta tanto como aproximadamente el 10 al 90% en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen fallo cardíaco congestivo asociado a aterosclerosis o hipertensión severa. Como alternativa, pueden diluirse partículas compuestas por lípidos irritantes a concentraciones bajas para reducir la inflamación en el sitio de administración.

20 Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden esterilizarse por técnicas de esterilización bien conocidas convencionales. Pueden envasarse soluciones acuosas para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, y cloruro de calcio. Además, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores lipídicos que protegen a los lípidos contra daños por radicales libres y peroxidativos de lípidos en almacenamiento. Son adecuados inactivadores de radicales libres lipófilos, tales como alfatocoferol y quelantes específicos de iones solubles en agua, tales como ferrioxamina.

30 **A. Administración *in vivo***

El suministro sistémico para terapia *in vivo*, es decir, suministro de un ácido nucleico terapéutico a una célula diana distal mediante sistemas corporales tales como la circulación, se ha conseguido usando partículas de ácido nucleico-lípido tales como las descritas en las publicaciones PCT N° WO 05/007196, WO 05/121348, WO 35 05/120152, y WO 04/002453. La presente descripción también proporciona partículas de ácido nucleico-lípido completamente encapsuladas que protegen el ácido nucleico de la degradación por nucleasa en suero, son no inmunogénicas, son de tamaño pequeño, y son adecuadas para repetir la dosificación.

40 Para administración *in vivo*, la administración puede ser de cualquier modo conocido en la técnica, por ejemplo, por inyección, administración oral, inhalación (por ejemplo, intranasal o intratraqueal), aplicación transdérmica, o administración rectal. La administración puede realizarse mediante una única dosis o dosis divididas. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse de forma parenteral, es decir, intra-articular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, o intramuscular. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal mediante inyección en embolada (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.286.634). El suministro de ácido nucleico intracelular también se ha analizado en Straubinger et al., Methods Enzymol., 101:512 (1983); Mannino et al., Biotechniques, 6:682 (1988); Nicolau et al., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 6:239 (1989); y Behr, Acc. Chem. Res., 26:274 (1993). Otros métodos más para administrar agentes terapéuticos basados en lípido se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 3.993.754; 4.145.410; 4.235.871; 4.224.179; 4.522.803; y 4.588.578. Las partículas de lípido-ácido nucleico pueden administrarse por inyección directa en el sitio de enfermedad o por inyección en un sitio distal del sitio de enfermedad (véase, por ejemplo, Culver, HUMAN GENE THERAPY, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, Nueva York, 50 pág.70-71(1994)).

55 Las composiciones descritas en este documento, solas o en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para administrarse mediante inhalación (por ejemplo, por vía intranasal o intratraqueal) (véase, Brigham et al., Am. J. Sci., 298:278 (1989)). Las formulaciones de aerosol puede colocarse en propelentes aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

60 En ciertas realizaciones descritas en este documento, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse por pulverizaciones intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de suministro en aerosol. Los métodos para suministrar composiciones de ácido nucleico directamente a los pulmones mediante pulverizaciones de aerosol nasal se han descrito, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos N° 5.756.353 y 5.804.212. Asimismo, el suministro de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente de Estados Unidos 5.725.871) también es conocido en las técnicas farmacéuticas. Asimismo, el suministro de fármacos a través de la mucosa en forma de una matriz de soporte de poli-tetrafluoroetileno se describe en la patente de Estados

Unidos N° 5.780.045.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vía intra-articular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutánea, incluyen soluciones de inyección acuosas y no acuosas, estériles isotónicas, que puede contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que vuelven a la formulación isotónica con la sangre del destinatario pretendido, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. En la práctica de esta descripción, las composiciones se administran preferiblemente, por ejemplo, por infusión intravenosa, vía oral, tópica, intraperitoneal, intra-vesical, o intratecal.

Generalmente, cuando se administran por vía intravenosa, las formulaciones de ácido nucleico-lípido se formulan con un vehículo farmacéutico adecuado. Pueden emplearse muchos vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones y métodos descritos en este documento. Las formulaciones adecuadas para su uso como se describe en este documento se encuentran, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Puede usarse una diversidad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, y similares, y pueden incluir glucoproteínas para estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Generalmente, se empleará solución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM) como vehículo farmacéuticamente aceptable, pero otros vehículos adecuados bastarán. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas convencionales de esterilización liposómica, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según lo necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse usando las técnicas mencionadas anteriormente o, como alternativa, pueden producirse en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración.

En ciertas aplicaciones, las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento pueden suministrarse mediante administración oral al individuo. Las partículas pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, troscos, cápsulas, píldoras, grageas, elixires, enjuagues bucales, suspensiones, pulverizaciones orales, jarabes, obleas, y similares (véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N° 5.641.515, 5.580.579, y 5.792.451). Estas formas orales de dosificación también pueden contener lo siguiente: aglutinantes, gelatina; excipientes, lubricantes, y/o agentes aromatizantes. Cuando la forma monodosis es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos anteriormente, un vehículo líquido. Pueden estar presentes otros diversos materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma monodosis debe ser farmacéuticamente pura y sustancialmente no tóxica en las cantidades empleadas.

Típicamente, estas formulaciones orales pueden contener al menos aproximadamente el 0,1% de las partículas de ácido nucleico-lípido o más, aunque el porcentaje de las partículas puede variarse, por supuesto, y puede ser convenientemente entre aproximadamente el 1% o el 2% y aproximadamente el 60% o el 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal modo que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier monodosis dada del compuesto. Los especialistas en la técnica contemplarán factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semi-vida biológica, vía de administración, vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas para preparar dichas formulaciones farmacéuticas, y por tanto, puede ser deseable una diversidad de dosificaciones y regímenes de tratamiento.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en: (a) soluciones líquidas, tal como una cantidad eficaz del ácido nucleico envasado (por ejemplo, ARN interferente) suspendida en diluyentes tales como agua, solución salina, o PEG 400; (b) cápsulas, sobrecitos, o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente), como líquidos, sólidos, gránulos, o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfato de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, colorantes, agentes disgregantes, y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de gragea pueden comprender el ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) en un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sacarosa y emulsiones de goma arábiga, geles, y similares que contienen, además del ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente), vehículos conocidos en la técnica.

En otro ejemplo de su uso, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden incorporarse en un amplio intervalo de formas tópicas de dosificación. Por ejemplo, puede formularse la suspensión que contiene las partículas de ácido nucleico-lípido y administrarse como geles, aceites, emulsiones, cremas tópicas, pastas, pomadas, lociones,

espumas, mousses, y similares.

Quando se preparan preparaciones farmacéuticas de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en este documento, es preferible usar cantidades de las partículas que se han purificado para reducir o eliminar las partículas vacías o partículas con ácido nucleico asociado con la superficie externa.

Los métodos descritos en este documento pueden ponerse en práctica en una diversidad de hospedadores. Los hospedadores preferidos incluyen especies de mamífero, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y chimpancés así como otros primates no humanos), caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, y porcinos.

La cantidad de partículas administrada dependerá de la proporción de ácido nucleico a lípido, el ácido nucleico particular usado, la patología que se esté diagnosticando, la edad, peso, y estado del paciente, y el criterio del médico, pero generalmente será 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, o aproximadamente 10^8 - 10^{10} partículas por administración (por ejemplo, inyección).

B. Administración *in vitro*

Para aplicaciones *in vitro*, el suministro de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente) puede ser a cualquier tipo celular en cultivo, ya sea de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas descritas en este documento, las células son células animales, más preferiblemente células de mamífero, y mucho más preferiblemente células humanas.

El contacto entre las células y las partículas de ácido nucleico-lípido, cuando se realiza *in vitro*, tiene lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de partículas varía ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero es generalmente entre aproximadamente 1 μ mol y aproximadamente 10 mmol. El tratamiento de las células con las partículas de ácido nucleico-lípido se realiza generalmente a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37°C) durante periodos de tiempo de aproximadamente 1 a 48 horas, preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 horas.

En un grupo de realizaciones preferidas descritas en este documento, una suspensión de partículas de ácido nucleico-lípido se añade a células sembradas en placa 60-80% confluyentes que tienen una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/ml, más preferiblemente aproximadamente 2×10^4 células/ml. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 μ g/ml, más preferiblemente aproximadamente 0,1 μ g/ml.

Usando un ensayo de parámetro de liberación endosómica (ERP), puede optimizarse la eficacia de suministro de la SNALP u otro sistema de vehículo basado en lípido. Un ensayo ERP se describe con detalle en la publicación de patente de Estados Unidos N° 20030077829. Más particularmente, el propósito de un ensayo ERP es distinguir el efecto de diversos lípidos catiónicos y componentes lipídicos auxiliares de las SNALP en base a su efecto relativo sobre la unión/captación o fusión con/destabilización de la membrana endosómica. Este ensayo permite determinar cuantitativamente el modo en que cada componente de la SNALP u otro sistema de vehículo basado en lípido afecta a la eficacia de suministro, optimizando de ese modo las SNALP u otros sistemas de vehículo basados en lípido. Habitualmente, un ensayo ERP mide la expresión de una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa, β -galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), etc.), y en algunos casos, una formulación SNALP optimizada para un plásmido de expresión también será apropiada para encapsular un ARN interferente. En otros casos descritos en este documento, un ensayo ERP puede adaptarse para medir la regulación negativa de la transcripción o traducción de una secuencia diana en presencia o ausencia de un ARN interferente (por ejemplo, ARNip). Comparando los ERP para cada una de las diversas SNALP u otras formulaciones basadas en lípido, se puede determinar fácilmente el sistema optimizado, por ejemplo, la SNALP u otra formulación basada en lípido que tiene la mayor captación en la célula.

C. Células para suministro de ARN interferente

Las composiciones descritas en este documento se usan para tratar una amplia diversidad de tipos celulares, *in vivo* e *in vitro*. Las células adecuadas incluyen, por ejemplo, células precursoras (madre) hematopoyéticas, fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos, células endoteliales, células de músculo esquelético y liso, osteoblastos, neuronas, linfocitos quiescentes, células diferenciadas de forma terminal, células primarias lentas o en reposo, células parenquimáticas, células linfoides, células epiteliales, células óseas, y similares. En realizaciones preferidas descritas en este documento, un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) se suministra a células cancerosas tales como, por ejemplo, células cancerosas de pulmón, células cancerosas de colon, células cancerosas rectales, células cancerosas anales, células cancerosas del conducto biliar, células cancerosas de intestino delgado, células cancerosas de estómago (gástricas), células cancerosas esofágicas, células cancerosas de vesícula biliar, células cancerosas de hígado, células cancerosas pancreáticas, células cancerosas del apéndice, células cancerosas de mama, células cancerosas de ovario, células cancerosas cervicales, células cancerosas de próstata, células

cancerosas renales, células cancerosas del sistema nervioso central, células tumorales de glioblastoma, células cancerosas cutáneas, células de linfoma, células tumorales de coriocarcinoma, células cancerosas de cabeza y cuello, células tumorales de sarcoma osteogénico, y células cancerosas sanguíneas.

El suministro *in vivo* de partículas de ácido nucleico-lípido que encapsulan un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) se adecuado para abordar células de cualquier tipo celular. Los métodos y composiciones pueden emplearse con células de una amplia diversidad de vertebrados, incluyendo mamíferos, tales como, por ejemplo, caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas, y cobayas), lagomorfos, porcinos, y primates (por ejemplo, monos, chimpancés, y seres humanos).

El grado de cultivo tisular de las células que puede requerirse, es bien conocido en la técnica. Por ejemplo, Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ª Ed., Wiley-Liss, Nueva York (1994), Kuchler et al., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. (1977), y las referencias citadas en el mismo proporcionan una guía general en cuanto al cultivo de células. Los sistemas celulares cultivados a menudo estarán en forma de monocapas de células, aunque también se usan suspensiones celulares.

D. Detección de SNALP

En algunas realizaciones descritas en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido son detectables en el sujeto a aproximadamente 8, 12, 24, 48, 60, 72, o 96 horas, o 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, o 28 días después de la administración de las partículas. La presencia de las partículas puede detectarse en las células, tejidos, u otras muestras biológicas del sujeto. Las partículas pueden detectarse, por ejemplo, por detección directa de las partículas, detección de la secuencia del ARN interferente (por ejemplo, ARNip), detección de la secuencia diana de interés (es decir, detectando la expresión o expresión reducida de la secuencia de interés), o una combinación de los mismos.

1. Detección de partículas

Las partículas de ácido nucleico-lípido pueden detectarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede acoplarse un marcador directa o indirectamente a un componente de la SNALP u otro sistema de vehículo usando métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse una amplia diversidad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el componente SNALP, los requisitos de estabilidad, y la instrumentación disponible y medidas de eliminación. Los marcadores adecuados incluyen, aunque sin limitación, marcadores espectrales tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Oregon Green™; rodamina y derivados tales como Texas red, isotiocianato de tetraarodimina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficeitrina, AMCA, CyDyes™, y similares; radiomarcadores tales como ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, etc.; enzimas tales como peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, etc.; marcadores colorimétricos espectrales tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico tales como poliestireno, polipropileno, látex, etc. El marcador puede detectarse usando cualquier medio conocido en la técnica.

2. Detección de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente) se detectan y cuantifican en este documento mediante cualquiera de varios medios bien conocidos para los especialistas en la técnica. La detección de ácidos nucleicos procede por métodos bien conocidos tales como análisis de Southern, análisis de Northern, electroforesis en gel, PCR, radiomarcaje, recuento de centelleo, y cromatografía de afinidad. También pueden emplearse métodos bioquímicos adicionales tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), y cromatografía por hiperdifusión.

La selección de un formato de hibridación de ácido nucleico no es crítica. Los especialistas en la técnica conocen una diversidad de formatos de hibridación de ácido nucleico. Por ejemplo, formatos comunes incluyen ensayos tipo sándwich y ensayos de competición o desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen en líneas generales en, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames y Higgins, IRL Press (1985).

La sensibilidad de los ensayos de hibridación puede potenciarse a través del uso de un sistema de amplificación de ácido nucleico que multiplica el ácido nucleico diana que se está detectando. Se conocen técnicas de amplificación *in vitro* adecuadas para amplificar secuencias para su uso como sondas moleculares o para generar fragmentos de ácido nucleico para posterior subclonación. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los especialistas en la técnica a través de dichos métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación con Qβ-replicasa y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA™) se encuentran en Sambrook et al., En Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); y Ausubel et al., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (2002); así como la patente de Estados Unidos Nº 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds.) Academic

Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim y Levinson (1 de octubre de 1990), C&EN36; The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991); Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826 (1989); Landegren et al., Science, 241:1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990); Wu y Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990); y Sooknanan y Malek, Biotechnology, 13:563 (1995). Se describen métodos mejorados para la clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro* en la Patente de Estados Unidos Nº 5.426.039. Otros métodos descritos en la técnica son los sistemas de amplificación basados en secuencia de ácido nucleico (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y de Q β -replicasa. Estos sistemas pueden usarse para identificar directamente mutantes donde los cebadores de PCR o LCR están diseñados para prolongarse o ligarse solamente cuando está presente una secuencia seleccionada. Como alternativa, las secuencias seleccionadas pueden amplificarse generalmente usando, por ejemplo, cebadores de PCR no específicos y la región diana amplificada después puede sondearse para una secuencia específica indicativa de una mutación.

Los ácidos nucleicos para su uso como sondas, por ejemplo, en métodos de amplificación *in vitro*, para su uso como sondas génicas, o como componentes inhibidores se sintetizan típicamente de forma química de acuerdo con el método de fosforamidita triéster en fase sólida descrito por Beaucage et al., Tetrahedron Letts., 22:1859 1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984). La purificación de polinucleótidos, cuando sea necesario, se realiza típicamente por electroforesis en gel de acrilamida nativo o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson et al., J. Carom., 255:137 149 (1983). La secuencia de los polinucleótidos sintéticos puede verificarse usando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman y Moldave (eds.) Academic Press, Nueva York, Methods in Enzymology, 65:499.

Un medio alternativo para determinar el nivel de transcripción es hibridación *in situ*. Los ensayos de hibridación *in situ* son bien conocidos y se describen en líneas generales en Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649 (1987). En un ensayo de hibridación *in situ*, las células se fijan en un soporte sólido, típicamente un portaobjetos de vidrio. Si tiene que sondearse ADN, las células se desnaturalizan con calor o álcali. Las células después se ponen en contacto con una solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de sondas específicas que están marcadas. Las sondas se marcan preferiblemente con radioisótopos o indicadores fluorescentes.

IX. Administración de agentes quimioterapéuticos

Algunas realizaciones descritas en este documento proporcionan un ARNip modificado o sistema de vehículo de la invención para su uso en un método *in vivo* para sensibilizar una célula cancerosa a los efectos de un fármaco quimioterapéutico. En realizaciones preferidas descritas en este documento, esta combinación de agentes terapéuticos se suministra a una célula cancerosa en un mamífero tal como un ser humano.

En ciertos aspectos descritos en este documento, un paciente próximo a comenzar quimioterapia se pretrata primero con una dosis adecuada de una o más partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que contienen ARN interferente para PLK-1 (por ejemplo, ARNip). El paciente puede pretratarse con una dosis adecuada de una o más partículas de ácido nucleico-lípido en cualquier momento puntual razonable antes de la administración del fármaco quimioterapéutico. Como ejemplos no limitantes, la dosis de una o más partículas de ácido nucleico-lípido puede administrarse aproximadamente 96, 84, 72, 60, 48, 36, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 horas, o cualquier intervalo de las mismas, antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

Además, un paciente próximo a comenzar quimioterapia puede pretratarse con más de una dosis de partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que contienen ARN interferente para PLK-1 (por ejemplo, ARNip) en diferentes momentos antes de la administración del fármaco quimioterapéutico. Por tanto, puede administrarse una segunda dosis de partículas de ácido nucleico-lípido antes de la administración del fármaco quimioterapéutico. En ciertos casos descritos en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido de la primera dosis son iguales a las partículas de ácido nucleico-lípido de la segunda dosis. En otros ciertos casos descritos en este documento, las partículas de ácido nucleico-lípido de la primera dosis son diferentes de las partículas de ácido nucleico-lípido de la segunda dosis. Preferiblemente, las dos dosis de pretratamiento usan las mismas partículas de ácido nucleico-lípido, por ejemplo, SNALP que contienen la misma secuencia de ARN interferente para PLK-1. Un especialista en la técnica apreciará que la segunda dosis de partículas de ácido nucleico-lípido puede suceder en cualquier momento razonable después de la primera dosis. Como ejemplo no limitante, si la primera dosis se administró aproximadamente 12 horas antes de la administración del fármaco quimioterapéutico, la segunda dosis puede administrarse aproximadamente 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, o 0,1 horas, o cualquier intervalo de las mismas, antes de la administración del fármaco quimioterapéutico. Un especialista en la técnica también apreciará que la segunda dosis de partículas de ácido nucleico-lípido puede ser la misma dosis o una diferente. En realizaciones adicionales descritas en este documento, el paciente puede pretratarse con una tercera, cuarta, quinta, sexta, séptima, octava, novena, décima, o superior dosis de las mismas o diferentes partículas de ácido nucleico-lípido antes de la administración del fármaco quimioterapéutico.

Un paciente también puede tratarse con una dosis adecuada de una o más partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que contienen ARN interferente para PLK-1 (por ejemplo, ARNip) en cualquier momento razonable durante la administración del fármaco quimioterapéutico. Por tanto, una dosis de partículas de ácido nucleico-lípido puede administrarse durante la administración del fármaco quimioterapéutico. Un especialista en la técnica apreciará que puede administrarse más de una dosis de partículas de ácido nucleico-lípido en diferentes momentos durante la administración del fármaco quimioterapéutico. Como ejemplo no limitante, puede administrarse una SNALP que contienen una secuencia de ARNip no modificada y/o modificada para PLK-1 al inicio de la administración del fármaco quimioterapéutico, mientras la administración del fármaco quimioterapéutico está en progreso, y/o al final de la administración del fármaco quimioterapéutico. Un especialista en la técnica también apreciará que las dosis pretratamiento e intra-tratamiento (es decir, durante la administración del fármaco quimioterapéutico) de partículas de ácido nucleico-lípido puede ser la misma dosis o una diferente.

Además, un paciente puede tratarse con una dosis adecuada de una o más partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que contienen ARN interferente para PLK-1 (por ejemplo, ARNip) en cualquier momento razonable después de la administración del fármaco quimioterapéutico. Por tanto, puede administrarse una dosis de partículas de ácido nucleico-lípido después de la administración del fármaco quimioterapéutico. Como ejemplos no limitantes, puede administrarse la dosis de una o más partículas de ácido nucleico-lípido aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, o más horas, o cualquier intervalo de las mismas, después de la administración del fármaco quimioterapéutico. En ciertos casos descritos en este documento, la misma partícula de ácido nucleico-lípido se usa antes y después de la administración del fármaco quimioterapéutico. En otros ciertos casos descritos en este documento, se usa una partícula diferente de ácido nucleico-lípido después de la administración del fármaco quimioterapéutico. Un especialista en la técnica apreciará que puede administrarse más de una dosis de partículas de ácido nucleico-lípido en diferentes momentos después de la administración del fármaco quimioterapéutico. Un especialista en la técnica también apreciará que las dosis pretratamiento y post-tratamiento (es decir, después de la administración del fármaco quimioterapéutico) de partículas de ácido nucleico-lípido pueden ser la misma dosis o una diferente.

Los fármacos quimioterapéuticos pueden administrarse con un excipiente farmacéutico adecuado según lo necesario y puede realizarse mediante cualquiera de los modos aceptados de administración. Por tanto, la administración puede ser, por ejemplo, oral, bucal, sublingual, gingival, palatal, intravenosa, tópica, subcutánea, transcutánea, transdérmica, intramuscular, intra-articular, parenteral, intra-arteriolar, intradérmica, intraventricular, intracraneal, intraperitoneal, intravesical, intratecal, intralesional, intranasal, rectal, vaginal, o por inhalación. Por "co-administrar" se entiende que un fármaco quimioterapéutico se administra al mismo tiempo, justo antes de, o justo después de la administración de un segundo fármaco o agente terapéutico (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido, otro fármaco quimioterapéutico, un fármaco útil para reducir los efectos secundarios asociados con quimioterapia, un agente radioterapéutico, un agente terapéutico hormonal, un agente inmunoterapéutico, etc.).

Ejemplos no limitantes de fármacos quimioterapéuticos adecuados para su uso como se describe en este documento incluyen fármacos basados en platino (por ejemplo, oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iproplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, flouxuridina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (taxol), docetaxel, etc.), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, irinotecano, topotecano, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), inhibidores de tirosina quinasa (por ejemplo, gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®; SU11248), erlotinib (Tarceva®; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec®; STI571), dasatinib (BMS-354825), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima™; ZD6474), etc.), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos.

Las partículas de ácido nucleico-lípido y/o fármacos quimioterapéuticos descritos en este documento también pueden co-administrarse con agentes terapéuticos hormonales convencionales incluyendo, aunque sin limitación, esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasa, tamoxifeno, y agonistas de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) tales como goserelina.

Además, las partículas de ácido nucleico-lípido y/o fármacos quimioterapéuticos descritos en este documento pueden co-administrarse con agentes inmunoterapéuticos convencionales incluyendo, aunque sin limitación, inmunoestimuladores (por ejemplo, bacilo Calmette-Guerin (BCG), levamisol, interleuquina-2, interferón alfa, etc.), anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-HER2, anti-CD52, anti-HLA-DR, y anti-VEGF), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de pseudomonas, etc.), y radio inmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ¹¹¹In, ⁹⁰Y, o ¹³¹I, etc.).

En una realización adicional, las partículas de ácido nucleico-lípido y/o fármacos quimioterapéuticos descritos en este documento pueden co-administrarse con agentes radioterapéuticos convencionales incluyendo, aunque sin limitación, radionúclidos tales como ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At , y ^{212}Bi , opcionalmente conjugados con anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.

Puede administrarse repetidamente una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco quimioterapéutico, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más veces, o la dosis puede administrarse por infusión continua. La dosis puede adoptar la forma de formas sólidas, semi-sólidas, en polvo liofilizado, o líquidas de dosificación, tales como, por ejemplo, comprimidos, píldoras, gránulos, cápsulas, polvos, soluciones, suspensiones, emulsiones, supositorios, enemas de retención, cremas, pomadas, lociones, geles, aerosoles, espumas, o similares, preferiblemente en formas monodosis para administración simple de dosificaciones precisas. Un especialista en la técnica apreciará que las dosificaciones administradas de fármacos quimioterapéuticos variarán dependiendo de varios factores incluyendo, aunque sin limitación, el fármaco quimioterapéutico o serie de fármacos quimioterapéuticos particulares a administrarse, el modo de administración, el tipo de aplicación, la edad del paciente, y el estado físico del paciente. Preferiblemente, debe usarse la dosis y concentración más pequeña requerida para producir el resultado deseado. La dosificación de ajustarse apropiadamente para niños, ancianos, pacientes debilitados, y pacientes con enfermedad cardíaca y/o hepática. Pueden obtenerse directrices adicionales a partir de estudios conocidos en la técnica usando modelos animales experimentales para evaluar la dosificación.

Como se usa en este documento, la expresión "forma monodosis" se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y otros mamíferos, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de un fármaco quimioterapéutico calculada para producir la aparición, tolerabilidad, y/o efectos terapéuticos deseados, en asociación con un excipiente farmacéutico adecuado (por ejemplo, una ampolla). Además, pueden prepararse formas de dosificación más concentradas, a partir de las cuales después pueden producirse formas monodosis más diluidas. Las formas de dosificación más concentradas por tanto contendrán sustancialmente más de, por ejemplo, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces las cantidad del fármaco quimioterapéutico.

Los métodos para preparar dichas formas de dosificación son conocidos para los especialistas en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)). Las formas de dosificación típicamente incluyen un vehículo o excipiente farmacéutico convencional y pueden incluir adicionalmente otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de permeación tisular, solubilizantes, y similares. Los excipientes apropiados pueden adaptarse a la forma de dosificación particular y la vía de administración por métodos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, *supra*).

Ejemplos de excipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábiga, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, solución salina, jarabe, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, y ácidos poliacrílicos tales como Carbopols, por ejemplo, Carbopol 941, Carbopol 980, Carbopol 981, etc. Las formas de dosificación pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio, y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes; agentes de suspensión; agentes conservantes tales como metil-, etil-, y propil-hidroxi-benzoatos (es decir, los parabenos); agentes de ajuste del pH tales como ácidos y bases inorgánicos y orgánicos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Las formas de dosificación también pueden comprender perlas de polímero biodegradable, dextrano, y complejos de inclusión de ciclodextrina.

Para administración oral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de comprimidos, cápsulas, emulsiones, suspensiones, soluciones, jarabes, pulverizaciones, grageas, polvos, y formulaciones de liberación sostenida. Los excipientes adecuados para administración oral incluyen grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, gelatina, sacarosa, magnesio carbonato, y similares.

En algunas realizaciones descritas en este documento, la dosis terapéuticamente eficaz adopta la forma de una píldora, comprimido, o cápsula, y por tanto, la forma de dosificación puede contener, junto con un fármaco quimioterapéutico, cualquiera de los siguientes: un diluyente tal como lactosa, sacarosa, fosfato dicálcico, y similares; un disgregante tal como almidón o derivados del mismo; un lubricante tal como estearato de magnesio y similares; y un aglutinante tal como almidón, goma arábiga, polivinilpirrolidona, gelatina, celulosa y derivados de la misma. Un fármaco quimioterapéutico también puede formularse en un supositorio dispuesto, por ejemplo, en un vehículo de polietilenglicol (PEG).

Las formas líquidas de dosificación puede prepararse disolviendo o dispersando un fármaco quimioterapéutico y opcionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables en un vehículo tal como, por ejemplo, solución salina acuosa (por ejemplo, cloruro sódico al 0,9% p/v), dextrosa acuosa, glicerol, etanol, y similares, para formar una solución o suspensión, por ejemplo, para administración oral, tópica, o intravenosa. También puede formularse un fármaco quimioterapéutico en un enema de retención.

Para administración tópica, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de emulsiones, lociones, geles, espumas, cremas, gelatinas, soluciones, suspensiones, pomadas, y parches transdérmicos. Para administración por inhalación, un fármaco quimioterapéutico puede suministrarse en forma de un polvo seco o en forma líquida mediante un nebulizador. Para administración parenteral, la dosis terapéuticamente eficaz puede estar en forma de soluciones inyectables estériles y polvos compactados estériles. Preferiblemente, las soluciones inyectables se formulan a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,5.

La dosis terapéuticamente eficaz también puede proporcionarse en una forma liofilizada. Dichas formas de dosificación pueden incluir un tampón, por ejemplo, bicarbonato, para reconstitución antes de administración, o el tampón puede incluirse en la forma liofilizada de dosificación para reconstitución con, por ejemplo, agua. La forma liofilizada de dosificación puede comprender adicionalmente un vasoconstrictor adecuado, por ejemplo, epinefrina. La forma liofilizada de dosificación puede proporcionarse en una jeringa, opcionalmente envasada en combinación con el tampón para reconstitución, de modo que la forma de dosificación reconstituida pueda administrarse inmediatamente a un sujeto.

X. Experimentos

La presente descripción se describirá en mayor detalle a modo de experimentos específicos. Los siguientes experimentos se ofrecen con fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los especialistas en la técnica reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados.

Experimento 1. Materiales y métodos.

ARNip: Todas las moléculas de ARNip usadas en estos estudios se sintetizaron químicamente por la University of Calgary (Calgary, AB), Dharmacon Inc. (Lafayette, CO), o Integrated DNA Technologies (Coralville, IA). Los ARNip se desalaron e hibridaron usando procedimientos convencionales.

Encapsulación de ARNip en lípidos: Salvo que se indique otra cosa, las moléculas de ARNip se encapsularon en partículas de ácido nucleico-lípido compuestas por los siguientes lípidos: colesterol sintético (Sigma-Aldrich Corp.; St. Louis, MO); el fosfolípido DSPC (1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfocolina; Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL); el PEG-lípido PEG-cDMA (3-N-[(metoxi poli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimirestiloil-propilamina); y el lípido catiónico DLinDMA (1,2-dilinoiloxi-3-(N,N-dimetil)aminopropano) en la proporción molar 48:10:2:40, respectivamente. En otras palabras, salvo que se indique otra cosa, los ARNip se encapsularon en liposomas de la siguiente formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DLinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol. En algunas realizaciones descritas en este documento, las moléculas de ARNip se encapsularon en partículas de ácido nucleico-lípido compuestas por los siguientes lípidos: el conjugado lipídico PEG-cDMA; el lípido catiónico DLinDMA; el fosfolípido DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina; Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL); y colesterol sintético en la proporción molar 1,4:57,1:7,1:34,3, respectivamente. En otras palabras, los ARNip se encapsularon en SNALP de la siguiente formulación "1:57": 1,4% de PEG-cDMA; 57,1% de DLinDMA; 7,1% de DPPC; y 34,3% de colesterol. En otras realizaciones descritas en este documento, las moléculas de ARNip se encapsularon en SNALP libres de fosfolípido compuestas por los siguientes lípidos: el conjugado lipídico PEG-cDMA; el lípido catiónico DLinDMA; y colesterol sintético en la proporción molar 1,5:61,5:36,9, respectivamente. En otras palabras, los ARNip se encapsularon en SNALP libres de fosfolípido de la siguiente formulación "1:62": 1,5% de PEG-cDMA; 61,5% de DLinDMA; y 36,9% de colesterol. Para controles de vehículo, se formaron partículas vacías con idéntica composición de lípidos en ausencia de ARNip. Debe entenderse que la formulación 1:57 y la formulación 1:62 son formulaciones diana, y que la cantidad de lípido (tanto catiónico como no catiónico) presente y la cantidad de conjugado lipídico presente en la formulación pueden variar. Típicamente, en la formulación 1:57, la cantidad de lípido catiónico será del 57% en mol $\pm$ 5% en mol, y la cantidad de conjugado lipídico será del 1,5% en mol $\pm$ 0,5% en mol, estando constituido el equilibrio de la formulación 1:57 de lípido no catiónico (por ejemplo, fosfolípido, colesterol, o una mezcla de los dos). Asimismo, en la formulación 1:62, la cantidad de lípido catiónico será del 62% en mol $\pm$ 5% en mol, y la cantidad de conjugado lipídico será del 1,5% en mol $\pm$ 0,5% en mol, estando constituido el equilibrio de la formulación 1:62 del lípido no catiónico (por ejemplo, colesterol).

Ensayo de viabilidad celular: La viabilidad celular de cultivos celulares *in vitro* se evaluó usando el reactivo comercial CellTiter-Blue® (Promega Corp.; Madison, WI), un colorante de resazurina que se reduce por células metabólicamente activas en el producto fluorogénico resorufina. Se cultivaron diversas líneas de células cancerosas *in vitro* usando técnicas convencionales de cultivo tisular. A las 48-72 horas después del tratamiento con formulaciones de ARNip y/o fármacos quimioterapéuticos, se añadió el reactivo CellTiter-Blue® al cultivo para cuantificar la actividad metabólica de las células, que es una medida de la viabilidad celular.

Cuantificación de ARNm diana: Se usó el ensayo de ADN ramificado QuantiGene® (Panomics, Inc.; Fremont, CA) para cuantificar la reducción de ARNm diana en cultivos celulares tratados con SNALP. Se prepararon lisados celulares de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se usan directamente para la cuantificación de ARNm de PLK1. Los niveles relativos de ARNm de PLK-1 se expresan respecto a las células de control tratadas con vehículo (PBS). Se diseñaron conjuntos de sondas específicas usadas para la detección de ARNm para abordar el ARNm

diana de PLK-1 humana (Nº de acceso a Genbank NM_005030). Estos conjuntos de sondas tienen reactividad cruzada con PLK-1 de ratón.

Ensayo de apoptosis/Caspasa 3/7: El nivel de actividad enzimática de caspasa 3 y 7 en células tratadas con ARNip se evaluó usando el reactivo comercial Apo-ONE® (Promega Corp., Madison, WI). Este ensayo se basa en la escisión enzimática específica del sustrato Caspasa 3/7 (Z-DEVD)2-Rodamina 110 en un producto fluorogénico y se usa para cuantificar el nivel de apoptosis en células cultivadas. El nivel relativo de actividad Caspasa 3/7 se evaluó en varias líneas de células cancerosas a las 24-48 horas después del tratamiento con formulaciones de ARNip y/o fármacos quimioterapéuticos.

Ensayos de inducción de citoquinas: Se generaron células dendríticas murinas derivadas de ligando Flt3 (Flt3L DC) como se describe por Gilliet et al. (J. Exp. Med., 195:953-958) usando 100 ng/ml de medio suplementado con ligando Flt3 murino (PeproTech Inc.; Rocky Hill, NJ). Se aislaron los fémures y tibias de ratones Balb/C hembra y se aclararon PBS estéril. Los extremos de los huesos se cortaron y se recogió la médula en medio completo (RPMI 1640, FBS inactivado por calor al 10%, penicilina/estreptomicina al 1%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 25 mM, 2-mercaptoetanol 50 µM). Las células de médula ósea se pasaron a través de un tamiz de 70 µm, se centrifugaron a 1000 rpm durante 7 minutos, y se resuspendieron en medio completo suplementado con 100 ng/ml de Flt3L murino hasta 2x10⁶ células/ml. Se sembraron 2 ml de células en placas de 6 pocillos y se añadió 1 ml de medio completo fresco cada dos o tres días. En el día 9 de cultivo, se lavaron las células no adherentes en medio completo y se sembraron en placas de 96 pocillos a concentraciones que varían de 0,5 a 2,5x10⁵ células/pocillo. Se diluyeron SNALP 2'OME-modificadas y no modificadas (0/0) para PLK-1 en PBS y se añadieron a cultivos de Flt3L DC a 5 µg/ml de ARNip. Las células se incubaron durante 24 horas a 37°C antes de ensayar los sobrenadantes para citoquinas por ELISA.

ELISA de citoquinas: Se cuantificaron el interferón-α e IL-6 en sobrenadantes de cultivo usando kits de ELISA tipo sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Éstos fueron IFN-α de ratón (PBL Biomedical; Piscataway, NJ) e IL-6 de ratón (eBioscience; San Diego, CA).

Experimento 2. Selección de moléculas candidatas de ARNip para PLK-1.

Se identificaron secuencias candidatas de ARNip para PLK-1 introduciendo la secuencia de ARNm de PLK-1 humana (Nº de acceso a Genbank NM_005030) o la secuencia de ARNm de PLK-1 de ratón (Nº de acceso a Genbank NM_011121) en el algoritmo de diseño de ARNip del Whitehead Institute for Biomedical Research (véase, por ejemplo, Elbashir et al., Genes Dev., 15:188-200 (2001); Schwarz et al., Cell, 115:199-208 (2003); y Khvorova et al. Cell, 115: 209-216 (2003); disponible en <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>). Se seleccionaron los ARNip que cumplían los siguientes criterios: (1) secuencias diana NN(N19)NN; (2) extremo antisentido 5' termodinámicamente menos estable (Diferencia < -2,0); (3) contenido en G/C entre el 30-70%; y (4) sin tramos de cuatro nucleótidos de la misma base. Las secuencias seleccionadas se verificaron y se identificaron las posiciones dentro de las secuencias diana tanto humana como de ratón.

Después se realizaron búsquedas BLASTn frente a bases de datos de secuencias humanas y de ratón sobre todas las secuencias seleccionadas. Se eliminaron secuencias que hibridaban de forma cruzada con > 15 de sus nucleótidos internos.

Las secuencias candidatas se muestran en las Tablas 1-2.

Tabla 1. Secuencias de ARNip que abordan la expresión de PLK-1 humana.

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID Nº	Hebra antisentido (5' → 3')	SEC ID Nº
PLK1424	AGAUCACCCUCCUJAAAUA	1	UAUUUAAGGAGGGUGAUCU	2
PLK773	AGACCUACCUCCGGAUCAA	3	UUGAUCCGGAGGUAGGUCU	4
PLK126	GUUCUAGUGGACCCACGC	5	GCGUGGGUCCACUAGGACC	6
PLK412	CUCCUGGAGCUGCACAAGA	7	UCUUGUGCAGCUCCAGGAG	8
PLK694	GUGGAUGUGUGGUCCAUUG	9	CAAUGGACCACACAUCCAC	10
PLK772	GAGACCUACCUCCGGAUCA	11	UGAUCCGGAGGUAGGUCUC	12
PLK832	GCCGCCUCCCUCAUCCAGA	13	UCUGGAUGAGGGAGGCGGC	14
PLK837	CUCCUCAUCCAGAAGAUG	15	CAUCUUCUGGAUGAGGAG	16
PLK1081	CCAGUGGUUCGAGAGACAG	17	CUGUCUCUGAACCACUGG	18
PLK1195	GAGGCUGAGGAUCCUGCCU	19	AGGCAGGAUCCUCAGCCUC	20
PLK1229	GGGUCAGCAAGUGGGUGGA	21	UCCACCCACUUGCUGACCC	22
PLK1232	UCAGCAAGUGGGUGGACUA	23	UAGUCCACCCACUUGCUGA	24
PLK1233	CAGCAAGUGGGUGGACUAU	25	AUAGUCCACCCACUUGCUG	26
PLK1242	GGUGGACUAUUCGGACAAG	27	CUUGUCCGAUAGUCCACC	28
PLK1345	GACAGCCUGCAGUACAUAG	29	CUAUGUACUGCAGGCUGUC	30
PLK1556	GCGCCAUAUCCUGCACCU	31	AGGUGCAGGAUGAUGGCGC	32

El número después de "PLK" en la Tabla 1 se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030. En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. Como ejemplo no limitante, la hebra con sentido de PLK1424 (SEC ID N° 1) puede contener un saliente 3' "UU" y la hebra antisentido de PLK1424 (SEC ID N° 2) puede contener un saliente 3' "UC". Como otro ejemplo no limitante, la hebra con sentido de PLK773 (SEC ID N° 3) puede contener un saliente 3' "GA" y la hebra antisentido de PLK773 (SEC ID N° 4) puede contener un saliente 3' "CU". En otras realizaciones descritas en este documento, el saliente 3' en la hebra con sentido, hebra antisentido, o ambas hebras puede comprender uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos modificados tales como los descritos anteriormente.

Tabla 2. Secuencias de ARNip que abordan la expresión de PLK-1 de ratón.

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID N°	Hebra antisentido (5' → 3')	SEC ID N°
mPLK1399	CCCAUCCCAAUUCCUUGAU	33	AUCAAGGAAUUGGGAUGGG	34
mPLK1424	AGAUCACUCUCCUCAACUA	35	UAGUUGAGGAGAGUGAUCU	36
mPLK1425	GAUCACUCUCCUCAACUUAU	37	AUAGUUGAGGAGAGUGAUC	38
mPLK1428	CACUCUCCUCAACUUAUUC	39	GAAAUAGUUGAGGAGAGUG	40
mPLK1434	CCUCAACUAAUUCGCAAU	41	AUUGCGGAAAUAGUUGAGG	42
mPLK1607	AGGACCACACCAAACUUAU	43	AUAAGUUUGGUGUGGUCCU	44
mPLK1608	GGACCACACCAAACUUAUC	45	GAUAAGUUUGGUGUGGUCC	46
mPLK1650	GACCUACAUAACGAGAAG	47	CUUCUCGUUGAUGUAGGUC	48
mPLK1668	GAGGGACUCCAAACGUAC	49	GUACGUUUGGAAGUCCUC	50

El número después de "mPLK" en la Tabla 2 se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 de ratón N_011121. En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En otras realizaciones descritas en este documento, los salientes 3' pueden comprender nucleótidos modificados tales como los descritos anteriormente.

Experimento 3. ARNip dirigidos a PLK-1 inhiben el crecimiento de células cancerosas.

Se formularon diversos ARNip para PLK-1 como SNALP (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DLinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) y se evaluaron para sus efectos inhibidores sobre el crecimiento celular *in vitro*. Se trataron células HT29 (adenocarcinoma de colon humano) o Neuro2A (neuroblastoma de ratón) con diversos SNALP para PLK-1 a un intervalo de concentraciones de ARNip y se evaluó su efecto sobre la viabilidad celular. La viabilidad de cultivos celulares se expresa como % de viabilidad respecto a controles tratados con PBS. La Figura 1A muestra que SNALP que contenían PLK1424 eran muy potentes en la eliminación de células tumorales humanas. Esta secuencia de ARNip es específica para PLK-1 humana, como se muestra por su inactividad en la línea celular de ratón (Figura 1B). Las SNALP que contenían PLK1081 o PLK1345 también inhibían el crecimiento de células tumorales humanas, pero a concentraciones mayores de ARNip (Figura 1A). PLK1345, que se diseñó para estar conservado entre PLK-1 murina y humana, fue eficaz en inhibir el crecimiento de células Neuro2A de ratón a concentraciones mayores de ARNip (Figura 1B). Se usó ARNip dirigido a Luciferasa (Luc) como SNALP de control.

Experimento 4. Silenciamiento dependiente de dosis de ARNm de PLK-1 en células cancerosas por ARNip dirigidos a PLK-1.

Se ensayaron SNALP para PLK-1 (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DLinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) para su capacidad de silenciar ARNm de PLK-1 en células HT29. Las células se sembraron en placa por duplicado a concentraciones relativamente elevadas (~10.000 células/pocillo). Se realizó análisis QuantiGene® a las 24 horas después de transfección para detectar el nivel de regulación negativa del ARNm. Se obtuvo un valor visual de las células transfectadas a las 48 horas después de la transfección. Se realizó análisis de viabilidad celular a las 72 horas después de transfección. La Figura 2A muestra el silenciamiento relativo de ARNm de PLK-1 por PLK1424 y PLK1081 a las 24 horas frente a control de ARNip no dirigido (GFP). La Figura 2B muestra los posteriores efectos de estos ARNip sobre la viabilidad celular a las 72 horas. Los resultados confirman que los potentes efectos de SNALP para PLK-1 sobre la viabilidad celular se debe al silenciamiento del ARNm de PLK-1.

Experimento 5. ARNip adicionales dirigidos a PLK-1 inhiben el crecimiento de células cancerosas.

Se formularon moléculas adicionales de ARNip para PLK-1 como SNALP (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DlinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) y se evaluaron para sus efectos inhibidores sobre el crecimiento celular *in vitro*. Se sembraron en placa células HT29 o Neuro2A por triplicado a 5000 células/pocillo y 2500 células/pocillo, respectivamente. Las dosificaciones de SNALP para PLK-1 fueron las siguientes: 25 nM; 5 nM; y 1 nM. Se realizó análisis de viabilidad celular a las 72 horas después de transfección. Las SNALP que contenían un ARNip no dirigido (GFP) se usaron como control negativo. La Figura 3A muestra que PLK694, PLK773, PLK832, PLK1195, PLK1229, PLK1233, PLK1424, y PLK1556 fueron eficaces en eliminar células tumorales humanas, demostrando PLK1424 los efectos más potentes. La Figura 3B muestra que mPLK1424 y mPLK1425 eran las secuencias de ARNip específicas de ratón más activas. PLK773 y PLK1229 fueron las moléculas de ARNip con reacción cruzada humano/ratón más potentes.

Experimento 6. ARNip dirigidos a PLK-1 son activos en diferentes líneas de células cancerosas de colon.

Se ensayaron SNALP que contenían ARNip PLK1424 o PLK773 (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DlinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) para sus efectos sobre la viabilidad celular y el silenciamiento del ARNm de PLK-1 en célula cancerosas de colon humano HT29 y LS174T. Las células se sembraron en placa por triplicado a ~10.000 células/pocillo. Las dosificaciones de SNALP fueron las siguientes: 30 nM; 10 nM; 3,3 nM; 1,1 nM; 0,37 nM; y 0,12 nM. Se realizaron ensayos de ARNm de ADN ramificado 24 horas después de la transfección. Se realizaron ensayos de viabilidad celular a las 72 horas después de transfección. Se usaron SNALP que contenían ARNip no dirigido (GFP) como control negativo. La Figura 4 muestra que los SNALP PLK1424 y PLK773 eran eficaces en reducir los niveles de ARNm de PLK-1 e inhibir el crecimiento celular en células tanto HT29 como LS174T. Los efectos sobre la viabilidad celular se correlacionan con el silenciamiento del ARNm diana de PLK-1.

Experimento 7. ARNip dirigidos a PLK-1 inducen la apoptosis en células cancerosas de colon.

Se ensayaron adicionalmente SNALP que contenían ARNip PLK1424 o PLK773 (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DlinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) para sus efectos sobre la inducción de la apoptosis de células LS174T. Las células se sembraron en placa por triplicado a ~10.000 células/pocillo. Las dosificaciones de SNALP fueron las siguientes: 30 nM; 10 nM; y 3,3 nM. Se realizaron ensayos de Caspasa 3/7 a las 24, 48, y 72 horas después de transfección. Se usaron SNALP que contenían un ARNip no dirigido (GFP) como control negativo. La Figura 5 muestra que los SNALP PLK1424 y PLK773 inducían una cantidad significativa de apoptosis en células LS 174T a todas las dosis ensayadas de SNALP.

Experimento 8. ARNip adicionales dirigidos a PLK-1 inhiben el crecimiento de células cancerosas.

Se formularon moléculas adicionales de ARNip para PLK-1 como SNALP (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DlinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) y se evaluaron para sus efectos inhibidores sobre el crecimiento celular *in vitro*. Se sembraron en placa células HT29 o Neuro2A por triplicado a 5000 células/pocillo y 2500 células/pocillo, respectivamente. Las dosificaciones de SNALP para PLK-fueron las siguientes: 30 nM; 10 nM; y 3,3 nM. Se realizó análisis de viabilidad celular a las 72 horas después de transfección. Se usaron SNALP que contenían un ARNip no dirigido (GFP) como control negativo. La Figura 6A muestra que PLK772, PLK1232, PLK1242, y PLK1424 fueron eficaces en eliminar células tumorales humanas, demostrando PLK1424 los efectos más potentes. La Figura 6B muestra que mPLK1607, mPLK1608, y mPLK1668 fueron las secuencias de ARNip para PLK-1 específicas de ratón más activas. PLK1232 fue la molécula de ARNip con reacción cruzada humano/ratón más potente.

Experimento 9. ARNip modificados para PLK-1 son no inmunoestimuladores e inhiben el crecimiento de células cancerosas.

Se formularon moléculas de ARNip para PLK-1 que contenían 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos en posiciones selectivas dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNip como SNALP (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DlinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) y se evaluaron para sus efectos inhibidores sobre el crecimiento celular *in vitro*. Las secuencias modificadas de ARNip para PLK-1 se muestran en la Tabla 3. Se sembraron en placa células HT29 por triplicado a 5000 células/pocillo. Se realizó análisis de viabilidad celular a las 72 horas después de transfección con un intervalo de dosificaciones de SNALP para PLK-1. Se usaron SNALP que contenían un ARNip no dirigido (GFP) como control negativo.

Tabla 3. Dúplex de ARNip que comprenden polinucleótidos ARN con sentido y antisentido de PLK-1.

ARNip	Secuencia de ARNip para PLK-1	% modificado en región BC
PLK1424	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUUANN-3' (SEC ID N° 51) 3'-NNUCUAGUGGGAGGAAUUUU-5' (SEC ID N° 52)	0/38 = 0%

ARNip	Secuencia de ARNip para PLK-1	% modificado en región BC
PLK1424 U3/GU	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEC ID N° 53) 3'-NNUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAU-5' (SEC ID N° 54)	5/38 = 13,2%
PLK1424 U3/UG	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEC ID N° 53) 3'-NNUC <u>U</u> AG <u>U</u> GGAGGAAUUUAU-5' (SEC ID N° 55)	7/38 = 18,4%
PLK1424 U3/G	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEC ID N° 53) 3'-NNUCUAG <u>U</u> GGAGGAAUUUAU-5' (SEC ID N° 56)	6/38 = 15,8%
PLK1424 U4/GU	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEC ID N° 57) 3'-NNUC <u>U</u> AGUGGGAGGAAUUUAU-5' (SEC ID N° 54)	6/38 = 15,8%
PLK1424 U4/UG	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEC ID N° 57) 3'-NNUC <u>U</u> AG <u>U</u> GGAGGAAUUUAU-5' (SEC ID N° 55)	8/38 = 21%
PLK1424 U4/G	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAAUANN-3' (SEC ID N° 57) 3'-NNUCUAG <u>U</u> GGAGGAAUUUAU-5' (SEC ID N° 56)	7/38 = 18,4%
PLK773	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 58) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 59)	0/38 = 0%
PLK773 U/U	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 60) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 61)	6/38 = 15,8%
PLK773 U/G	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 60) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 62)	7/38 = 18,4%
PLK773 U/GU	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 60) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 63)	6/38 = 15,8%
PLK773 G/U	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 64) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 61)	5/38 = 13,2%
PLK773 G/G	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 64) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 62)	6/38 = 15,8%
PLK773 G/GU	5'-AGACCUACCUCCGGAUCAANN-3' (SEC ID N° 64) 3'-NNUCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5' (SEC ID N° 63)	5/38 = 13,2%
PLK1425	5'-GAUCACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 65) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 66)	0/38 = 0%
PLK1425 3/2	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 67) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 66)	3/38 = 7,9%
PLK1425 3/5	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 67) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 68)	5/38 = 13,2%
PLK1425 3/6	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 67) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 69)	6/38 = 15,8%
PLK1425 3/7	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 67) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 70)	7/38 = 18,4%
PLK1425 3/8	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 67) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 71)	7/38 = 18,4%
PLK1425 4/2	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 72) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 66)	4/38 = 10,5%
PLK1425 4/5	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 72) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 68)	6/38 = 15,8%
PLK1425 4/6	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 72) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 69)	7/38 = 18,4%
PLK1425 4/7	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 72) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 70)	8/38 = 21%
PLK1425 4/8	5'-GA <u>U</u> CACCCUCCUAAAAUANN-3' (SEC ID N° 72) 3'-NNCUAGUGGGAGGAAUUUAUA-5' (SEC ID N° 71)	8/38 = 21%

Columna 1: El número después de "PLK" se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030.

Columna 2: Los 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos se indican en negrita y subrayados. El ARNip puede comprender alternativa o adicionalmente 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). N = nucleótido desoxitimidina (dT), ribonucleótido uridina (U) modificada o no modificada, o ribonucleótido modificado o no modificado que tiene complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma.

Columna 3: Se proporcionan la cantidad y porcentaje de nucleótidos modificados en la región bicatenaria (BC) del dúplex de ARNip.

La Figura 7 muestra que diferentes patrones de modificación química en la secuencia de ARNip PLK1424 se toleraban bien y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad. Las moléculas modificadas de ARNip más activas, PLK1424 U4/GU y PLK1424 U3/GU, fueron tan potente como la secuencia no modificada PLK1424 en la eliminación de células tumorales humanas. PLK1424 U4/G y PLK1424 U3/G mostraron actividad

similar a la de la secuencia no modificada PLK1424. También se ensayaron SNALP que contenían ARNip PLK1424 2'OMe-modificados para la actividad inmunoestimuladora en cultivos de FLT3L DC murinas. La Figura 8 muestra que los ARNip PLK1424 modificados no inducían respuesta detectable de citoquinas (es decir, IL-6 o IFN- α) en este sistema de cultivo celular.

La Figura 9 muestra que diferentes patrones de modificación química en la secuencia de ARNip PLK773 se toleraban bien y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad. La molécula modificada de ARNip más activa, PLK773 G/GU, fue más potente que la secuencia no modificada PLK1424 en la eliminación de células tumorales humanas. PLK773 G/U y PLK773 U/GU mostraron actividad similar a la de la secuencia no modificada PLK773.

La Figura 10 muestra que diferentes patrones de modificación química en la secuencia de ARNip PLK1425 se toleran bien y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad. La molécula modificada de ARNip más activa, PLK1425 3/5, fue más potente que la secuencia no modificada PLK1425 en la eliminación de células tumorales humanas. Los ARNip PLK1425 que contenían hebra antisentido modificada 5, 7, o 8 retenían actividad iARN.

Este experimento ilustra que modificaciones 2'OMe mínimas en posiciones selectivas en el dúplex de ARNip para PLK-1 son suficientes para disminuir las propiedades inmunoestimuladoras de los ARNip para PLK-1 reteniendo al mismo tiempo actividad iARN. En particular, modificaciones selectivas de 2'OMe-uridina y/o 2'OMe-guanosina en menos de aproximadamente el 25% de las posiciones de nucleótido en la región bicatenaria proporcionan ARNip para PLK-1 con una combinación deseable de propiedades de silenciamiento y no inmunoestimuladoras.

Experimento 10. Pretratamiento con SNALP para PLK-1 sensibiliza células cancerosas a los efectos de fármacos quimioterapéuticos.

Se evaluaron SNALP que contenían ARNip PLK1424 U4/GU o PLK773 G/GU (formulación SNALP "2:40": 2% de PEG-cDMA; 40% de DlinDMA; 10% de DSPC; y 48% de colesterol) para determinar si la dosificación secuencia de la SNALP antes del tratamiento con fármaco quimioterapéutico produce efectos sinérgicos *in vitro* en líneas celulares humana y de ratón. Se sembraron en placa células HepG2 (carcinoma hepático hepatocelular humano) y Neuro2A por triplicado a 10.000 células/pocillo y 5000 células/pocillo, respectivamente. Se añadieron SNALP que contenían las moléculas modificadas de ARNip para PLK-1 a las células 24 horas después de la siembra en placa a un intervalo de dosificaciones. Se cambió el medio y se añadieron los fármacos quimioterapéuticos a las células 24 horas después del tratamiento con SNALP a un intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, las dosis de paclitaxel (taxol) variaron entre 0,31 nM-10 nM para células humanas y 6,25 nM-200 nM para células de ratón. Se realizó ensayos de viabilidad celular o un ensayo de apoptosis a las 48 o 24 horas después del tratamiento con fármaco quimioterapéutico, respectivamente. Se usaron SNALP que contenían un ARNip no dirigido (Luc) como control negativo.

La Figura 11 muestra que la administración secuencial de SNALP para PLK-1 seguido de paclitaxel potenció significativamente la eliminación de células tanto Neuro2A como HepG2. En particular, dosis subóptimas de SNALP para PLK-1 y paclitaxel fueron más eficaces que cualquier agente en solitario. Se observaron efectos sinérgicos similares para la terapia de combinación secuencial con SNALP para PLK-1 seguido de fluorouracilo (5-FU) o irinotecano a dosis superiores de SNALP. La Figura 12 muestra que la dosificación de combinación secuencial de SNALP para PLK-1 seguida de paclitaxel potenciaba significativamente el nivel de inducción de apoptosis a ambas concentraciones de SNALP. La apoptosis aumentada se correlacionaba con los efectos potenciados de esta combinación de fármacos sobre la viabilidad celular.

Este experimento ilustra que el pretratamiento con SNALP que contenían ARNip para PLK-1 sensibiliza células cancerosas a los efectos tóxicos de fármacos quimioterapéuticos tales como paclitaxel, 5-FU, e irinotecano. Este experimento ilustra adicionalmente que la administración secuencial de SNALP para PLK-1 seguida de fármacos quimioterapéuticos induce niveles significativos de apoptosis en células cancerosas, que se correlacionan con las disminuciones en la viabilidad celular observada con esta combinación de dosificación.

Experimento 11. Selección de moléculas candidatas adicionales de ARNip para PLK-1 humana.

Se diseñaron secuencias adicionales de ARNip para PLK-1 humana. Las secuencias candidatas de ARNip para PLK-1 se identificaron introduciendo la secuencia de ARNm de PLK-1 humana (Nº de acceso a Genbank NM_005030) en el algoritmo de diseño de ARNip del Whitehead Institute for Biomedical Research (véase, por ejemplo, Elbashir et al., Genes Dev., 15:188-200 (2001); Schwarz et al., Cell, 115:199-208 (2003); y Khvorova et al Cell, 115:209-216 (2003); disponible en <http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/home.php>). Se seleccionaron los ARNip que cumplían los siguientes criterios (Tabla 4): (1) secuencias diana NA(N19)NN; (2) extremo antisentido 5' termodinámicamente menos estable (Diferencia < -2,0); (3) contenido en G/C entre el 30-70%; y (4) sin tramos de cuatro nucleótidos de la misma base. Se seleccionó un segundo conjunto de ARNip (Tabla 5) según los siguiente criterios: (1) secuencias diana NN(N19)NN; (2) extremo antisentido 5' termodinámicamente menos estable (Diferencia < -2,0); (3) Termodinámica del extremo antisentido 5' > -6 (-6 a 0); (4) contenido en G/C entre el 30-70%;

y (5) son tramos de cuatro nucleótido de la misma base. Las secuencias seleccionadas se verificaron y se identificaron las posiciones dentro de la secuencia diana de PLK-1 humana.

Después se realizaron búsquedas BLASTn frente a las bases de datos de secuencias humanas y de ratón sobre todas las secuencias. Se eliminaron las secuencias que hibridaban de forma cruzada con >17 de sus nucleótidos internos.

Las secuencias candidatas se muestran en las Tablas 4-5.

Tabla 4. Secuencias adicionales de ARNip que abordan la expresión de PLK-1 humana.

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID N°	Hebra antisentido (5' → 3')	SEC ID N°
PLK(-23)	GGUCUGCAGCGCAGCUUCG	73	CGAAGCUGCGCUGCAGACC	74
PLK(-15)	GCGCAGCUUCGGGAGCAUG	75	CAUGCUCGCCGAAGCUGCGC	76
PLK272	AGCCGCACCAGAGGGAGAA	77	UUCUCCCUUCUGGUGCGGCU	78
PLK273	GCCGCACCAGAGGGAGAAG	79	CUUCUCCCUUCUGGUGCGGC	80
PLK288	GAAGAUGUCCAUGGAAUA	81	UAUUUCCAUGGACAUCUUC	82
PLK363	GGACAACGACUUCGUGUUC	83	GAACACGAAGUCGUUGUCC	84
PLK420	GCUGCACAAGAGGAGGAAA	85	UUCCUCCCUUCUGGCAGC	86
PLK429	GAGGAGGAAAGCCUGACU	87	AGUCAGGGCUUCCUCCUC	88
PLK431	GGAGGAAAGCCUGACUGA	89	UCAGUCAGGGCUUCCUCC	90
PLK438	AGCCUGACUGAGCCUGAG	91	CUCAGGCUCAGUCAGGGCU	92
PLK439	GCCUGACUGAGCCUGAGG	93	CCUCAGGCUCAGUCAGGGC	94
PLK450	GCCUGAGGCCCGAUACUAC	95	GUAGUAUCGGGCCUCAGGC	96
PLK456	GGCCCGAUACUACCUACGG	97	CCGUAGGUAGUAUCGGGCC	98
PLK498	CCUGCACCGAAACCGAGUU	99	AACUCGGUUUCGGUGCAGG	100
PLK504	CCGAAACCGAGUUAUUAU	101	AUGAAUAACUCGGUUUCGG	102
PLK589	CUGGCAACCAAAGUCGAU	103	AUUCGACUUUGGUUGCCAG	104
PLK618	GAGGAAGAAGACCCUGUGU	105	ACACAGGGUCUUCUCCUC	106
PLK627	GACCCUGUGUGGGACUCCU	107	AGGAGUCCACACAGGGUC	108
PLK629	CCCUGUGUGGGACUCCUA	109	UAGGAGUCCACACAGGG	110
PLK663	GGUGCUGAGCAAGAAAGGG	111	CCCUUUCUUGCUCAGCACC	112
PLK693	GGUGGAGUGUGGUCCAUA	113	AAUGGACCACAUCCACC	114
PLK710	UUGGGUGUAUCAUGUAUAC	115	GUUAUCAUGAUACACCCAA	116
PLK736	GUGGGCAAACCAACUUUUG	117	CAAAAGGUGGUUUGCCAC	118
PLK744	ACCACUUUUGAGACUUCU	119	AGAAGUCUCAAAGGUGGU	120
PLK745	CCACUUUUGAGACUUCUU	121	AAGAAGUCUCAAAGGUGG	122
PLK774	GACCUACCUCGGAUCAAG	123	CUUGAUCCGGAGGUAGGUC	124
PLK776	CCUACCUCGGAUCAAGAA	125	UUCUUGAUCCGGAGGUAGG	126
PLK780	CCUCCGGAUCAAGAAGAU	127	AUUCUUCUUGAUCCGGAGG	128
PLK884	CCAUAACGAGCUGCUUAA	129	UUAAGCAGCUCGUUAAUGG	130
PLK894	GCUGCUUAAUGACGAGUUC	131	GAACUCGUCAUUAAGCAGC	132
PLK903	UGACGAGUUCUUACUUCU	133	AGAAGUAAAGAACUCGUCA	134
PLK1024	GUCCUCAUAAAGGCUUGG	135	CCAAGCCUUUAUUGAGGAC	136
PLK1137	GACGUGGCAGUGUCAAU	137	AUUGACACUGUGCAGCUGC	138
PLK1235	GCAAGUGGGUGGACUAUUC	139	GAAUAGUCCACCCACUUGC	140
PLK1319	CACGCCUCAUCCUCUACAA	141	UUGUAGAGGAUGAGGCGUG	142
PLK1321	CGCCUCAUCCUCUACAAUG	143	CAUUGUAGAGGAUGAGGCG	144
PLK1347	CAGCCUGCAGUACAUAGAG	145	CUCUAUGUACUGCAGGCUG	146
PLK1363	GAGCGUGACGGCACUGAGU	147	ACUCAGUGCCGUCACGCUC	148
PLK1404	UCCCAACUCCUUGAUGAAG	149	CUUCAUCAAGGAGUUGGGA	150
PLK1409	ACUCCUUGAUGAAGAAGAU	151	AUCUUCUUCAUCAAGGAGU	152
PLK1422	GAAGAUCACCCUCCUUAUA	153	UUUAAGGAGGGUGAUCUUC	154
PLK1430	CCCUCCUUAUAUUAUCCG	155	CGGAAUAUUAUUAAGGAGG	156
PLK1457	UGAGCGAGCACUUGCUGAA	157	UUCAGCAAGUGCUCGCUCA	158
PLK1550	CCCGCAGCGCCAUAUCCU	159	AGGAUGAUGGCGCUGCGGG	160
PLK1577	GCAACGGCAGCGUGCAGAU	161	AUCUGCACGUGCCGUUGC	162
PLK1580	ACGGCAGCGUGCAGAUCAA	163	UUGAUCUGCACGUGCCGU	164
PLK1581	CGGCAGCGUGCAGAUCAAC	165	GUUGAUCUGCACGUGCCG	166
PLK1586	GCGUGCAGAUCAACUUCUU	167	AAGAAGUUGAUCUGCACGC	168
PLK1620	GCUAUCUUGUGCCACUG	169	CAGUGGGCACAAGAUGAGC	170
PLK1640	UGGCAGCCGUGACCUACAU	171	AUGUAGGUCACGGCUGCCA	172
PLK1645	GCCGUGACCUACAUCGACG	173	CGUCGAUGUAGGUCACGGC	174

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID Nº	Hebra antisentido (5' → 3')	SEC ID Nº
PLK1658	UCGACGAGAAGCGGGACUU	175	AAGUCCCGCUUCUCGUCGA	176
PLK1667	AGCGGGACUCCGCACAUAA	177	UAUGUGCGGAAGUCCCGCU	178
PLK1668	GCGGGACUCCGCACAUAC	179	GUAUGUGCGGAAGUCCCGC	180
PLK1704	GGAGUACGGCUGCUGCAAG	181	CUUGCAGCAGCCGUACUCC	182
PLK1775	GCUCACGCUCGCCAGCAA	183	UUGCUGGCCGAGCGUGAGC	184
PLK1794	CCGUCUCAAGGCCUCCUAA	185	UUAGGAGGCCUUGAGACGG	186

El número después de "PLK" en la Tabla 4 se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030. En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En otras realizaciones, los salientes 3' pueden comprender nucleótidos modificados tales como los descritos anteriormente.

Tabla 5. Secuencias adicionales de ARNip que abordan la expresión de PLK-1 humana.

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID Nº	Hebra antisentido (5' → 3')	SEC ID Nº
PLK287	AGAAGAUGUCCAUGGAAAU	187	AUUUCCAUGGACAUCUUCU	188
PLK461	GAUACUACCUACGGCAAU	189	AUUUGCCGUAGGUAGUAUC	190
PLK500	UGCACCGAAACCGAGUUAU	191	AUAACUCGGUUUCGGUGCA	192
PLK591	GGCAACCAAAGUCGAUAU	193	AUAUUCGACUUUGGUUGCC	194
PLK630	CCUGUGUGGGACUCCUAAU	195	AUUAGGAGUCCACACAGG	196
PLK632	UGUGUGGGACUCCUAAUUA	197	UAAUUAGGAGUCCACACA	198
PLK1016	CCCUCACAGUCCUCAAUAA	199	UUUUAGGAGUCCACAGG	200
PLK1017	CCUCACAGUCCUCAAUAAA	201	UUUUAGGAGUCCUAGAGG	202
PLK1018	CUCACAGUCCUCAAUAAAG	203	CUUUUUAGGAGUCCUAGAG	204
PLK1795	CGUCUCAAGGCCUCCUAAU	205	AUUAGGAGGCCUUGAGACG	206
PLK1796	GUCUCAAGGCCUCCUAAUA	207	UAAUUAGGAGGCCUUGAGAC	208
PLK1797	UCUCAAGGCCUCCUAAUAG	209	CUAAUUAGGAGGCCUUGAGA	210

El número después de "PLK" en la Tabla 5 se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030. En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido comprende nucleótidos modificados tales como 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). En algunos casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' "dTdT" o "UU". En otros casos descritos en este documento, la hebra con sentido y/o antisentido contiene salientes 3' que tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En otras realizaciones descritas en este documento, los salientes 3' pueden comprender nucleótidos modificados tales como los descritos anteriormente.

Experimento 12. ARNip dirigidos a PLK-1 aumentan la supervivencia de ratones que albergan tumores Hep3B.

Se ensayaron SNALP que contenían ARNip para PLK-1 (formulación SNALP "1:57": 1,4% de PEG-cDMA; 57,1% de DLinDMA; 7,1% de DPPC; y 34,3% de colesterol) para sus efectos sobre la supervivencia de ratones CD1 nu/nu que albergan tumores hepáticos Hep3B.

Grupos experimentales

Se sembraron 20 ratones CD1 nu/nu del siguiente modo:

Grupo	Nº ratones	Siembra de tumor	SNALP	Nº ratones	Dosificación IV de SNALP	Dosis de SNALP	Sacrificio	Ensayo
A	20 hasta siembra	I.H. 1,5x10 ⁶ Hep3B	Luc 1:57	9	Días 11, 14, 17, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42	10x2 mg/kg	Cuando moribundos	Supervivencia Pesos corporales
B			PLK 1424 1:57	9				

Artículos de ensayo

Todas las muestras se esterilizaron por filtración antes de dilución a concentración de trabajo. Todos los tubos se etiquetaron con la fecha de formulación, la composición de lípidos, y la concentración de ácido nucleico. Las muestras de SNALP se proporcionaron a 0,2 mg/ml de ácido nucleico. Se requirió un mínimo de 20 ml de cada SNALP para realizar el estudio. Las formulaciones para este estudio contenían:

Grupo	Descripción del artículo de ensayo
A	SNALP 1:57 Luc U/U (lípidos 28 mM)
B	SNALP 1:57 PLK1424 U4/GU (lípidos 28 mM) SNALP 1:57 PLK1424 U4/G (lípidos 28 mM)

Procedimientos**Día 0**

Los ratones recibieron Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina) inmediatamente antes de cirugía. Los ratones individuales se anestesiaron por inhalación de gas isoflurano y se les aplicó lubricación ocular para evitar secado excesivo de los ojos. Mientras se mantienen en anestesia con gas desde un cono nasal, se hará una única incisión de 1,5 cm a través de la línea media por debajo del esternón. Después se exterioriza el lóbulo hepático lateral izquierdo usando un bastoncillo de lana de algodón tratado en autoclave. Se inyectan 25 µl de células tumorales suspendidas en PBS en el lóbulo a un ángulo llano usando una jeringa Hamilton de punta luer (50 µl) y aguja 30G (9,5 mm (3/8")). Las células se inyectarán lentamente (~30 s) y se aplicará un hisopo a la herida perforada inmediatamente después de retirar la aguja. Después de haber detenido cualquier hemorragia (~1 min), se cierra la incisión con 5-6 suturas en la pared muscular y 3-4 grapas. Las suspensiones celulares se mezclarán minuciosamente inmediatamente antes de cada inyección. Los ratones se recuperarán de la anestesia en una jaula limpia revestida de papel absorbente y se controlarán exhaustivamente durante 2-4 horas. Los animales después se devuelven al alojamiento normal.

Día 1

Todos los ratones se anestesiaron ligeramente por gas isoflurano y se examinan las suturas. Los animales después recibirán Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina).

Día 10

Los ratones se asignarán aleatoriamente a los grupos de tratamiento apropiados.

Día 11

Grupos A, B - Día 11: A todos los animales se les administrará SNALP a 2 mg/kg por inyección IV mediante la vena lateral de la cola. Se dosificará a los ratones de acuerdo con el peso corporal (10 ml/kg). La dosificación se repetirá durante 5 días consecutivos en base al peso inicial.

Día 14-35

Grupos A, B - Días 14, 17, 21, 25, 28, 32, 35: A todos los animales se les volverá a administrar SNALP a 2 mg/kg por inyección IV mediante la vena lateral de la cola. Se dosificará a los ratones de acuerdo con el peso corporal (10 ml/kg).

Grupos de peso corporal: Se pesará a los ratones en el día de la dosificación durante 5 semanas, después dos veces a la semana hasta cerrar el estudio.

Criterio de valoración: Se espera que se toleren bien la carga tumoral y las formulaciones. Los ratones que muestren signos de sufrimiento asociado con el tratamiento o la carga tumoral se cesan a juicio del personal del vivario.

Cese:

Los ratones se anestesian con una dosis letal de ketamina/xilazina seguida de dislocación cervical.

Análisis de datos: Se ensayan la supervivencia y los pesos corporales.

Resultados

La Figura 13 muestra los pesos corporales medios de ratones durante la dosificación terapéutica de SNALP PLK1424 en el modelo de tumor intrahepático (I.H.) Hep3B. El régimen de tratamiento se toleró bien sin signos aparentes de toxicidad relacionada con el tratamiento.

La Figura 14 muestra que el tratamiento con PLK1424 formulado en SNALP causaba un aumento significativo en la supervivencia de ratones que albergan tumores Hep3B. Este efecto anti-tumoral *in vivo* se observó en ausencia de cualquier toxicidad aparente o estimulación inmune.

Experimento 13. ARNip dirigidos a PLK-1 aumentan la supervivencia de ratones que albergan tumores Hep3B.

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

1. Determinar el nivel de silenciamiento de ARNm en tumores hepáticos Hep3B establecidos después de una única administración IV de SNALP PLK1424.
2. Confirmar el mecanismo de silenciamiento del ARNm detectando productos de escisión del ARN específicos usando RACE-PCR.
3. Confirmar la inducción de apoptosis de células tumorales por histopatología.

La formulación SNALP "1:57" (1,4% de PEG-cDMA; 57,1% de DLinDMA; 7,1% de DPPC; y 34,3% de colesterol) se usó para este estudio.

Grupos experimentales

Se sembraron 20 ratones SCID/beige del siguiente modo:

Grupo	Nº ratones	Siembra de tumor	SNALP	Nº ratones	Dosificación IV de SNALP	Sacrificio	Ensayo
A	20 hasta siembra	I.H. 1x10 ⁶ Hep3B	PBS	6	1 x 2 mg/kg Día 20	24 h después de tratamiento	QG tumor RACE-PCR de tumor Histopatología
B			Luc 1:57	7			
C			PLK 1424 1:57	7			

Artículos de ensayo

Todas las muestras se esterilizaron por filtración antes de dilución a concentración de trabajo. Todos los tubos se etiquetaron con la fecha de formulación, la composición de lípidos, y la concentración de ácido nucleico. Las muestras de SNALP se proporcionaron a 0,2 mg/ml de ácido nucleico. Se requirió un mínimo de 2 ml de SNALP para realizar el estudio. Las formulaciones para este estudio contenían:

Procedimientos

Día 0

Los ratones recibirán Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina) inmediatamente antes de la cirugía. Los ratones individuales se anestesiaron por inhalación de gas isoflurano y se les aplicó lubricación ocular para evitar secado excesivo de los ojos. Mientras se mantienen en anestesia con gas desde un cono nasal, se hará una única incisión de 1,5 cm a través de la línea media por debajo del esternón. Después se exterioriza el lóbulo hepático lateral izquierdo usando un bastoncillo de lana de algodón tratado en autoclave. Se inyectan 25 µl de células tumorales suspendidas en PBS en el lóbulo a un ángulo llano usando una jeringa Hamilton de punta luer (50 µl) y aguja 30G (9,5 mm (3/8")). Las células se inyectarán lentamente (~30 s) y se aplicará un hisopo a la herida perforada inmediatamente después de retirar la aguja. Después de haber detenido cualquier hemorragia (~1 min), se cierra la incisión en la pared muscular con 5-6 suturas. La incisión en la piel entonces se cierra con 3-4 grapas metálicas. Las suspensiones celulares se mezclarán minuciosamente inmediatamente antes de cada inyección. Los ratones se recuperarán de la anestesia en una jaula limpia revestida de papel absorbente y se controlarán exhaustivamente durante 2-4 horas. Los animales después se devuelven al alojamiento normal.

Día 1

Todos los ratones se anestesiaron ligeramente por gas isoflurano y se examinan las suturas. Los animales después recibirán Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina).

Día 7

Los ratones se asignarán aleatoriamente a los grupos de tratamiento apropiados.

Día 20

Grupos A-C: Se pesará a los ratones y después se les administrará PBS, SNALP Luc, o PLK1424 por inyección IV mediante la vena lateral de la cola. La SNALP se dosificará a 2 mg/kg o volumen equivalente (10 ml/kg) de acuerdo con el peso corporal.

Día 21

Grupos A-C: Todos los ratones se pesarán y después se sacrificarán por anestesia letal. Se pesaran los lóbulos hepáticos que albergan tumor de todos los ratones de cada grupo y se recogerán en RNALater para el análisis de ARN.

Criterio de valoración: Se espera que se toleren bien la carga tumoral y las formulaciones. Los ratones que muestren signos de sufrimiento asociado con el tratamiento o la carga tumoral se cesan a juicio del personal del vivario.

Cese:

Los ratones se anestesian con una dosis letal de ketamina/xilazina seguida de dislocación cervical.

Análisis de datos:

Análisis de ARNm de tumores hepáticas por ensayo de ADNb (QG) y RACE-PCR. Apoptosis de células tumorales por histopatología.

Resultados

Los pesos corporales se controlaron desde el día 14 en adelante para evaluar la progresión del tumor. En el día 20, 6 ratones que mostraban la mayor pérdida de peso se asignaron aleatoriamente a cada uno de los 3 grupos y se

trataron. Los seis ratones tenían tumores I.H. sustancialmente grandes en el momento del sacrificio (día 21). El tratamiento de los 14 ratones restantes por lo tanto se inició en el día 21 (sacrificio día 22). 10/14 ratones tenían tumores sustanciales; 2/14 ratones tenían tumores pequeños/probables; y 2/14 ratones no tenían carga tumoral visible.

La Figura 15 muestra datos de ensayos Quantigene usados para medir los niveles de ARNm de PLK-1 específicos de ser humano (tumor). Una única dosis de 2 mg/kg de SNALP PLK1424 U4/GU redujo los niveles de ARNm de PLK-1 en aproximadamente el 50% en tumores Hep3B intrahepáticos que crecen en ratones.

La Figura 16 muestra que era detectable un producto de escisión específico de ARNm de PLK-1 en ratones tratados con SNALP PLK1424 por 5' RACE-PCR. No fue detectable producto de PCR específico en ratones tratados con PBS o SNALP de control (Luc). La secuenciación de nucleótidos del producto de PCR confirmó el sitio de escisión predicho por interferencia de ARN mediada por ARNip PLK1424 en el ARNm de PLK-1.

La Figura 17 muestra la histología de tumores Hep3B en ratones tratados con SNALP Luc (parte superior) o SNALP PLK1424 (parte inferior). Los ratones tratados con SNALP Luc presentaron mitosis normales en tumores Hep3B, mientras que ratones tratados con SNALP PLK1424 mostraron numerosas mitosis aberrantes y apoptosis de células tumorales en tumores Hep3B.

Conclusión

Este experimento ilustra que una única administración de SNALP PLK1424 a ratones que albergan tumores Hep3B inducía silenciamiento *in vivo* significativo del ARNm de PLK-1. Se confirmó que esta reducción en el ARNm de PLK-1 estaba mediada por interferencia de ARN usando análisis 5' RACE-PCR. De forma importante, el silenciamiento del ARNm de PLK-1 por PLK1424 formulado en SNALP alteraba profundamente la proliferación de células tumorales (mitosis), causando posterior apoptosis de las células tumorales. Como se ha demostrado en el ejemplo previo, este efecto anti-tumoral se tradujo en tiempos prolongados de supervivencia en los ratones que albergan tumores.

Experimento 14. Comparación de SNALP para PLK-1 que contiene PEG-cDMA o PEG-cDSA en un modelo de tumor Hep3B subcutáneo.

Este experimento demuestra la utilidad del PEG-lípido PEG-cDSA (3-N-[(metoxipoli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-diesteriloxipropilamina) en la formulación 1:57 para abordar de forma sistémica tumores distales (por ejemplo, subcutáneos). En particular, este experimento compara la capacidad de abordar tumores de SNALP para PLK-1 que contienen PEG-cDMA (C₁₄) o PEG-cDSA (C₁₈). Las lecturas son inhibición del crecimiento tumoral y silenciamiento de ARNm de PLK1. El ARNip para PLK-1 usado fue PLK1424 U4/GU, cuya secuencia se proporciona en la Tabla 3.

Se establecieron tumores Hep3B subcutáneos (S.C.) en ratones scid/beige. Se evaluó la eficacia anti-tumor multi-dosis de SNALP para PLK-1 para los siguientes grupos (n=5 para cada grupo): (1) "Luc-cDMA" - PEG-cDMA SNALP Luc; (2) "PLK-cDMA" - PEG-cDMA SNALP para PLK-1; y (3) "PLK-cDSA" - PEG-cDSA SNALP para PLK-1. Se inició la administración de 6 x 2 mg/kg de ARNip una vez que los tumores alcanzaron aproximadamente 5 mm de diámetro (día 10). La dosificación se realizó en los días 10, 12, 14, 17, 19, y 21. Los tumores se midieron mediante calibre dos veces a la semana.

La Figura 18 muestra que múltiples dosis de SNALP para PLK-1 que contienen PEG-cDSA inducían la regresión de tumores Hep3B S.C. establecidos. En particular, 5/5 tumores en los ratones tratados con PLK1-cDSA aparecieron planos, medibles solamente por descoloración en el sitio del tumor.

La Figura 19 muestra el silenciamiento del ARNm de SNALP para PLK en tumores Hep3B S.C. después de una única administración intravenosa de SNALP. El grado de silenciamiento observado con el SNALP PLK1-cDSA se correlacionó con la actividad anti-tumoral en el estudio multi-dosis mostrado en la Figura 18.

Al grupo tratado con SNALP Luc-cDMA, que había desarrollado grandes tumores S.C. en el día 24, se le administró después SNALP PLK-cDSA en los días 24, 26, 28, 31, 33, y 35. No hubo dosificación adicional de los grupos originales tratados con SNALP para PLK-1. Los resultados de este estudio de acción cruzada con tumores establecidos grandes se proporcionan en la Figura 20, que muestra que el SNALP PLK1-cDSA inhibía el crecimiento de tumores Hep3B S.C. grandes.

Se realizó una comparación del efecto de los SNALP PEG-cDMA y PEG-cDSA 1:57 sobre el silenciamiento del ARNm de PLK-1 usando tumores Hep3B intrahepáticos establecidos en ratones scid/beige. Se administró por vía intravenosa una única dosis de 2 mg/kg de SNALP para PLK-1 que contenía PEG-cDMA o PEG-cDSA. Se recogieron muestras de hígado/tumor a las 24 y 96 horas después del tratamiento con SNALP. Control = 2 mg/kg de SNALP Luc-cDMA a las 24 horas.

La Figura 21 muestra que SNALP PLK-cDMA y SNALP PLK-cDSA tenían actividades similares de silenciamiento después de 24 horas, pero que la SNALP PLK-cDSA puede aumentar la duración del silenciamiento del ARNm en

tumores intrahepáticos.

La Figura 22 muestra el perfil de eliminación en sangre de SNALP para PLK-1 que contienen PEG-cDMA o PEG-cDSA. Los tiempos prolongados de circulación en sangre observados para la SNALP PLK-cDSA pueden posibilitar la acumulación y actividad aumentadas en sitios tumorales distales (por ejemplo, subcutáneos).

Por tanto, este estudio muestra que la formulación de SNALP PEG-cDSA puede usarse para abordar preferentemente tumores fuera del hígado, mientras que la SNALP PEG-cDMA puede usarse para abordar preferentemente el hígado.

Experimento 15. Confirmación del mecanismo de acción mediado por iARN de agentes terapéuticos contra el cáncer basados en ARNip.

Los ARN interferentes cortos (ARNip) que silencian específicamente la expresión de genes relacionados con el cáncer ofrecen un nuevo enfoque terapéutico en oncología. Sin embargo, sigue siendo crítico delinear el mecanismo real subyacente a su actividad terapéutica. Este experimento describe el desarrollo de ARNip químicamente modificado dirigido a las proteínas esenciales del ciclo celular quinasa 1 tipo Polo (PLK-1) y proteína del huso quinesina (KSP; también conocida como Eg5). El ARNip formulado en nanopartículas lipídicas (SNALP) presentó potente eficacia anti-tumoral en modelos de tumor tanto hepático como subcutáneo, mostrando un grado de silenciamiento génico diana después de una única administración intravenosa que fue suficiente para causar alteración mitótica extensiva y apoptosis de células tumorales. La especificidad y el mecanismo de acción del ARNip se confirmó por: (1) el uso de formulaciones apropiadamente diseñadas de ARNip que no inducían respuesta inmune medible, excluyendo por lo tanto el potencial de eficacia no específica; (2) inducción de productos de escisión de ARNm específicos de iARN en células tumorales; (3) correlación de esta característica de iARN activa con la duración del silenciamiento del ARNm diana; y (4) confirmación de la inhibición de la diana funcional por biomarcadores histológicos. Este experimento proporciona resultados que representan un avance significativo en el desarrollo de agentes terapéuticos contra el cáncer basados en ARNip, y sirve para poner de relieve los requisitos técnicos necesarios para apoyar una conclusión de que la iARN es el mecanismo principal de los efectos terapéuticos mediados por ARNip.

Introducción

Los ARN interferentes cortos (ARNip) son moléculas de ARN bicatenario específicas de diana diseñadas para suprimir la expresión génica a través del proceso celular endógeno de interferencia de ARN (iARN) (1). Desde la caracterización de este mecanismo de silenciamiento génico fundamental, se han hecho muchos progresos en el desarrollo de ARNip como una clase potencialmente nueva de agentes terapéuticos para un amplio espectro de enfermedades incluyendo cáncer, infección vírica, y trastornos metabólicos.

Se han descrito muchas dianas de ARNip en oncología en la bibliografía, aunque se carece de forma notable de evidencias directas de que sus efectos terapéuticos en modelos de tumor estén mediados por iARN. La interpretación de la actividad anti-tumoral atribuible a ARNip se problemática debido al potencial de efectos fuera de diana de los ácidos nucleicos, incluyendo su propensión a activar respuestas inmunes a través de mecanismos dependientes (2-4) e independientes (5, 6) de TLR. Estos tipos de respuesta son conocidos por provocar efectos anti-tumores, principalmente a través de las acciones de interferones y citoquinas inflamatorias que ejercen efectos anti-angiogénicos, pro-apoptóticos, y adyuvantes que potencian la inmunidad celular (7, 8). Muchos de estos mecanismos permanecen activos en las cepas de ratón inmunodeficientes típicamente usadas como hospedadores para xenoinjertos de tumor humano, incluyendo ratones SCID/beige que carecen de poblaciones funcionales de linfocitos y células NK (9, 10). La inducción de la respuesta inmune innata por ácidos nucleicos también puede tener consecuencias toxicológicas significativas (11). La experiencia clínica con ciertas citoquinas recombinantes y agonistas de TLR (12, 13) incluyendo ADN plasmídico liposómico ha demostrado que los sujetos humanos puede ser espléndidamente sensibles a los efectos tóxicos de estos agentes en comparación con modelos preclínicos. Por lo tanto, se requiere precaución adicional si se considera un ARNip inmunoestimulador para desarrollo clínico (14, 15).

La incorporación de químicas de nucleótidos modificados en ARNip se ha utilizado ampliamente para mejorar sus propiedades farmacológicas y resistentes a nucleasa (16). Primero se informó de que la modificación química extensiva de moléculas de ARNip podría proporcionar el beneficio adicional de evitar su reconocimiento por el sistema inmune de mamífero (17). Esto ha conducido al diseño racional de construcciones de ARNip 2'-O-metil (2'OME) modificadas que tienen de forma inherente bajo potencial inmunoestimulador *in vivo* (18).

Para establecer pruebas de que los ARNip administrados de forma sistémica pueden provocar eficacia anticancerosa mediada por iARN en ausencia de activación inmune medible, se seleccionaron las proteínas esenciales del ciclo celular proteína del huso quinesina (KSP, Eg5) (19) y quinasa 1 tipo Polo (PLK-1) (20) como dianas validadas de cáncer con mecanismos bien caracterizados de eliminación directa de células tumorales. KSP es una proteína motora del huso mitótico que dirige la segregación de cromosomas durante la mitosis. La inhibición de KSP bloquea la formación de husos mitóticos bipolares, causando detención del ciclo celular, activación del punto de control mitótico e inducción de apoptosis (21). En células de mamífero, PLK-1 actúa fosforilando varias proteínas

de ciclo celular, incluyendo Cdc25C, ciclina B, subunidad SCC-1 de cohesina, subunidades del complejo promotor de anafase, proteína 1 tipo quinesina de mamífero, y otras proteínas relacionadas con quinesina. Esta serie diversa de sustratos refleja las múltiples tareas de PLK-1 en mitosis y citocinesis (22). La sobre-expresión de PLK-1, observada en muchos tipos de tumor humano, es un pronosticador negativo de desenlace del paciente (20), mientras que la inhibición de la actividad PLK-1 induce rápidamente la detección mitótica y la apoptosis de la célula tumoral (23, 24). El agotamiento de PLK-1 también puede sensibilizar células cancerosas a la actividad pro-apoptótica de fármacos de molécula pequeña (25), probablemente debido al papel de PLK-1 en los puntos de control de daño en el ADN y ensamblaje del huso.

Una de las barreras principales para conseguir el potencial de los agentes terapéuticos de ARNip es la necesidad de vehículos de suministro de fármacos para facilitar el direccionamiento al sitio de enfermedad, la captación celular, y el suministro citoplásmico del ARNip (26-28). Enfoques comunes para suministro incluyen formación de complejos del ARNip con policationes tales como polietilenoimina (29, 30) y polímeros de ciclo-dextrina (31) o incorporación en vehículos basados en lípido catiónico (17, 18, 26, 32). Se ha descrito previamente el desarrollo de partículas estables de ácido nucleico-lípido (SNALP) como un vehículo de suministro sistémico eficaz para dirigir ARNip al hígado murino y de primate no humano y han mostrado efectos terapéuticos en el silenciamiento de transcritos génicos de hepatocitos endógenos (18, 26) y virales (17). La acumulación de SNALP dentro de tejidos de interés clínico aprovecha el direccionamiento pasivo al sitio de enfermedad (33, 34), mediante el cual pueden pasar vehículos de carga neutra de tamaño adecuado (aproximadamente 100 nm de diámetro o más pequeños) a través del epitelio fenestrado de tumores, sitios de inflamación, y el hígado sano. Esto evita la necesidad de restos de direccionamiento activo tales como péptidos, anticuerpos, y ligandos de receptor que pueden por lo demás ser candidatos para la incorporación en vehículos de suministro de ARNip para potenciar la selectividad de célula diana (31, 35, 36).

Este experimento describe el desarrollo de ARNip formulados en SNALP como nuevos agentes terapéuticos contra el cáncer. Los resultados demuestran que ARNip diseñados de forma racional dirigidos a PLK-1 o KSP, cuando se suministran con un vehículo eficaz de suministro sistémico, son capaces de realizar silenciamiento génico terapéutico en tumores sólidos. La especificidad y mecanismo de acción se confirman usando una combinación de metodologías que demuestran el silenciamiento mediado por iARN de ARNm diana causando alteración mitótica en células tumorales típica de inhibición de diana. Esto puede conseguir en ausencia completa de estimulación inmune a través del uso de ARNip químicamente modificados diseñados apropiadamente.

Resultados

Caracterización *in vitro* de actividad ARNip para PLK-1

PLK-1 representa una diana génica validada en oncología cuya inhibición se sabe que causa detención mitótica y apoptosis en cultivos de células tumorales en proliferación (20). Se diseñó y seleccionó un panel de nuevos ARNip para PLK-1 para la actividad anti-proliferativa en la línea de células cancerosas de colon humano HT29 (Figura 23). Esta selección identificó PLK1424 como el ARNip humano más potente y PLK773 como el ARNip más potente de reacción cruzada con ratón, rata, y ser humano basada en la homología de secuencia de PLK-1. Estos ARNip principales se formularon en una composición SNALP que ha demostrado dirigir de forma eficaz los ARNip al hígado de roedores y primates no humanos (26). El tratamiento de células HT29 con los ARNip PLK1424 y PLK773 formulados causó una disminución dependiente de dosis en la viabilidad celular que se correlacionaba con el grado de silenciamiento del ARNm de PLK-1 (Figura 24A-C). El ARNip PLK1424 presentó potente actividad en un intervalo de líneas de células cancerosas humanas, incluyendo las líneas celulares de carcinoma de colon LS174T y de carcinoma hepatocelular (HCC) HepG2 y He3B (Figura 24D), que estaba asociada con la inducción dependiente de dosis de la apoptosis 48 h después de la transfección del ARNip (Figura 24E).

Diseño de ARNip para PLK-1 y KSP para aplicaciones *in vivo*

Antes de la evaluación *in vivo* del ARNip sintético, es esencial anticipar los efectos potenciales de la estimulación inmune sobre el sistema biológico en consideración y adoptar medidas para mitigar este riesgo (11). Se ha informado previamente de que la introducción selectiva de restos de 2'OMe-guanosina o 2'OMe-uridina en ARNip anula la capacidad de activar una respuesta inmune (18, 37). Esta estrategia original proponía restringir las modificaciones 2'OMe a la hebra con sentido del ARNip para minimizar el potencial de impacto negativo en la actividad iARN (18). Aunque este enfoque sigue siendo ampliamente aplicable para ARNip sintéticos (37), se ha descubierto a través de extensiones a nuestros estudios originales que ciertas secuencias de ARNip que incorporan una hebra con sentido 2'OMe-modificada, por ejemplo el dúplex U(S)-ApoB1 (18), puede retener actividad inmunoestimuladora de bajo grado. Esto se evidenció solamente por la inducción de ARNm de p56 IFIT1 inducible por IFN en el hígado y bazo después de administración intravenosa de ARNip U(S)-ApoB1 formulado en SNALP en ratones, a pesar de no haber respuesta medible de citoquinas en suero (Figura 25). Esta inducción residual de IFIT1, sin embargo, podría anularse completamente por la introducción selectiva de 2'OMe nucleótidos en la hebra antisentido (AS) del dúplex (Figura 25). Estos hallazgos proporcionar el fundamento para nuestro diseño y ensayo de 2'OMe ARNip contra dianas de oncología.

Se aplicó un enfoque similar al diseño de ARNip para PLK1424 y PLK773 para generar dúplex que no poseyeran efectos medibles de estimulación inmune reteniendo al mismo tiempo completa actividad iARN. Esta etapa se consideró como un pre-requisito para la realización de estudios *in vivo* para concluir la especificidad de efectos anti-tumores que puedan observarse. Se sustituyeron nucleótidos 2'OMe-U o 2'OMe-G en los oligonucleótidos nativos con sentido y AS para formar un panel de dúplex modificados PLK1424 y PLK773 (Tabla 6) que después se seleccionaron para la conservación de actividad iARN. Los dúplex 2'OMe-PLK1424 que contienen las hebras AS modificadas A o B mostraron actividad anti-proliferativa similar a la secuencia PLK1424 nativa cuando aparearon con cualquiera de las hebras con sentido modificadas 1 ó 2. 2'OMe-PLK1424 que contiene la hebra AS C presentó actividad anti-proliferativa a concentraciones mayores (Figura 26A). El panel de dúplex 2'OMe-PLK773 presentó diferencias moderadas en la actividad en comparación con la secuencia PLK773 nativa (Figura 26B). Se seleccionaron los dúplex de ARNip PLK1424-2/A y PLK773-1/B (que comprenden las hebras con sentido/AS 2'OMe-modificadas designadas) para evaluación en un modelo de estimulación inmune *in vitro*. Como se esperaba, el ARNip PLK1424 y PLK773 nativo y su ARN monocatenario constituyente (ARNmc) estimularon células dendríticas derivadas de ligando Flt3 murino para producir altos niveles tanto de IFN- α como de IL-6 (Figura 26C), mientras que esta reactividad inmune estuvo completamente anulada en los dúplex PLK1424-2/A y PLK773-1/B.

Tabla 6. Secuencias de ARNip para PLK-1, KSP, y Luc con patrones de 2'OMe modificación.

Nombre	Hebra	Secuencia (5'-3'21 mero)	SEC ID N°
PLK1424	S	AGAUCACCCUCCUUAUUAUU	211
PLK1424	AS	UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU	212
PLK1424-1	S	AGAUCACCCUCCUUAUUAUU	213
PLK1424-2	S	AGAUCACCCUCCUUAUUAUU	214
PLK1424-A	AS	UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU	215
PLK1424-B	AS	UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU	216
PLK1424-C	AS	UAUU UAAG GAGGGUGAUCUUU	217
PLK773	S	AGACCUACCUCGGAUCAAUU	218
PLK773	AS	UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU	219
PLK773-1	S	AGACCUACCUCGGAUCAAUU	220
PLK773-2	S	AGACCUACCUCGGAUCAAUU	221
PLK773-A	AS	UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU	222
PLK773-B	AS	UUGAU CCGGAGGUAGGUCU UU	223
PLK773-C	AS	UUGAUCCGGAGGUAGGUCUUU	224
KSP2263	S	CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT	225
KSP2263	AS	AUUGUCUUCAGGUCUUCAGdTdT	226
KSP2263-U	S	CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT	227
KSP2263-G	S	CUGAAGACCUGAAGACAAUdTdT	228
KSP2263-U	AS	AUUGUCUUCAGGUCUUCAGdTdT	229
KSP2263-G	AS	AUUGUCUUCAGGUCUUCAGdTdT	230
Luc	S	GAUUAUGUCCGGUUAUGUAAU	231
Luc	AS	UACAUAACCGGACAUAAUCUU	232
Luc-U	S	GAUUAUGUCCGGUUAUGUAAU	233
Luc-U	AS	UACAUAACCGGACAUAAUCUU	234

Los 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos se indican en negrita y subrayados. La hebra con sentido (S) o antisentido (AS) puede comprender alternativa o adicionalmente 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA).

Para demostrar la utilidad de este enfoque para el diseño de ARNip, se aplicó la misma metodología a un ARNip publicado dirigido a KSP (38). El ARNip para KSP seleccionado (llamado KSP2263 a partir de su descripción original) tiene homología de secuencia completa con el ARNm de KSP de ratón y ser humano y mostró potentes efectos anti-proliferativos en líneas de células cancerosas tanto humanas como de ratón. Como ejemplo, el tratamiento de células Neuro2a de ratón con KSP2263 formulado en SNALP indujo reducciones dependientes de dosis en el ARNm de KSP 24 h después de transfección, que se correlaciona con una pérdida posterior de viabilidad celular a las 72 h (Figura 26D). Después se seleccionó un panel de dúplex KSP2263 modificados que contenían nucleótidos 2'OMe-U o 2'OMe-G (Tabla 6) en este ensayo. En este caso, cada combinación de las dos hebras modificadas con sentido y AS generó un dúplex con potencia equivalente a la secuencia KSP2263 nativa, confirmando la conservación de la actividad iARN (Figura 26E). Se seleccionó la variante 2'OMe-modificada KSP2263-U/U para caracterización adicional.

Confirmación del mecanismo de iARN por 5' RACE-PCR

La detección de productos de escisión de ARN específicos generados por hidrólisis de ARNm diana mediada por RISC es el marcador definitivo que confirma iARN como el mecanismo de silenciamiento génico (39, 40). RISC activado escinde ARNm diana de forma precisa entre los nucleótidos complementarios a las posiciones 10 y 11 de la hebra AS del ARNip generando un producto de escisión de ARNm que es único para la secuencia de ARNip. Éste puede detectarse en células usando un método de PCR diseñado apropiadamente de amplificación rápida de extremos de ADNc 5' (RACE-PCR). Se desarrollaron ensayos RACE-PCR para detectar el producto de escisión específico de PLK1424 de ARNm de PLK-1 humana y el producto de escisión específico de KSP2263 de ARNm de KSP de ratón. El tratamiento de células HT29 con PLK1424-2/A generó el producto de 5' RACE-PCR predicho de 476 pb y la secuenciación del oligonucleótido a través del sitio de ligamiento 5' confirmó su identidad como el producto de ARNm de PLK-1 humana escindido en la posición 5' 1433 (respecto al codón de inicio ATG) (Figura 27). Asimismo, se amplificó un producto de RACE-PCR predicho de 102 pb a partir de células Neuro2a tratadas con ARNip KSP2263-U/U que correspondía con el ARNm de KSP de ratón escindido en la posición 2129 (Figura 27).

Caracterización de la respuesta inmune a ARNip 2'OMe PLK-1 y KSP in vivo

Para confirmar la anulación de la estimulación inmune por el 2'OMe ARNip *in vivo*, se trataron por vía intravenosa ratones Balb/c con PLK1424-2/A, PLK773-1/B, KSP2263-U/U formulado en SNALP, o un 2'OMe ARNip de control dirigido a luciferasa (Luc-U/U). Se evaluó el ARNm de IFIT1 y las citoquinas séricas 4-6 h después de la administración de SNALP en base al tiempo aproximado de respuesta máxima para estos marcadores. En estos estudios, se usó el ARNip Luc nativo formulado en SNALP (Tabla 6) como control positivo para estimulación inmune. La administración intravenosa de este ARNip no modificado indujo aumentos de 83 veces y 247 veces en el ARNm de IFIT1 en el hígado y el bazo, respectivamente, en comparación con controles tratados con PBS (Figura 28A). Esto fue coherente con la detección de IFN- α sistémico en estos animales (Figura 28B). En contraste, los ARNip PLK1424-2/A, PLK773-1/B, KSP2263-U/U, o Luc-U/U no indujeron IFN- α medible o aumento en el ARNm de IFIT1 en el hígado o el bazo respecto a animales tratados con PBS, lo que confirma que estos ARNip formulados en SNALP no causaban señalización IFN discernible en el hígado como órgano diana principal para esta formulación o en tejidos linfoides secundarios (Figura 28). Como se ha presentado previamente (18), la administración de 2'OMe ARNip formulado en SNALP no indujo aumento en otras citoquinas séricas incluyendo IL-6, IL-10, IL-12, TNF, o IFN γ y presentó una ausencia similar de reactividad inmune en cultivos celulares inmunes humanos primarios.

Este enfoque de diseño y selección de ARNip puede aplicarse a cualquier secuencia dada para identificar rápidamente ARNip en que las modificaciones químicas se toleren bien con respecto a la actividad iARN y anulen completamente de forma prevista la estimulación inmune. A diferencia de otras estrategias de modificación química para ARNip, la potenciación de la resistencia a nucleasa no fue una consideración de diseño principal ya que se sabe que la SNALP, el vehículo de suministro pretendido para estudios *in vivo*, protege al ARNip no modificado de la degradación por nucleasa durante más de 24 h en suero (18). Sin embargo, el patrón de modificación 2'OMe puede tener en cuenta la elusión de: (1) la posición 9 en la hebra con sentido en base a la observación de que la activación eficaz de RISC implica la escisión inicial de la hebra con sentido del ARNip entre las posiciones 9-10 y ésta puede inhibirse mediante la introducción de químicas resistentes a nucleasa en este enlace (41, 42); y (2) el extremo antisentido 5' donde químicas modificadas pueden interferir con la carga eficaz de ARN en RISC (43, 44).

Inhibición terapéutica de crecimiento tumoral por administración sistémica de ARNip

Se establecieron modelos de tumor hepático ortotópico para examinar la farmacodinámica y eficacia terapéutica de ARNip PLK1424-2/A y KSP2263-U/U formulado en SNALP. Éstos fueron un xenoinjerto Hep3B en ratones scid/beige como modelo representativo de HCC human y un modelo de tumor Neuro2a singénico en ratones A/J inmunocompetentes. Las células tumorales se inyectaron directamente en el lóbulo hepático lateral izquierdo para establecer tumores intrahepáticos primarios (45). Este procedimiento provocó nódulos tumorales localizados histológicamente distintos en más del 90% de los ratones en ambos modelos.

Para evaluar la eficacia terapéutica de ARNip para PLK1 formulado en SNALP, se trataron ratones que albergaban tumores hepáticos Hep3B establecidos con 2 mg/kg de ARNip PLK1424-2/A o Luc-U/U por administración intravenosa dos veces a la semana durante 3 semanas, hasta que los grupos de control presentaron síntomas de carga tumoral extensiva. Se ha descubierto que la pérdida de peso corporal progresiva es un buen indicador de carga tumoral hepática en el modelo de ratón Hep3B-scid/beige. La pérdida de peso en ratones tratados con Luc-U/U fue evidente 12-16 días después del implante del tumor y continuó durante todo el resto del estudio (Figura 29A). En contraste, los ratones tratados con SNALP PLK1424-2/A típicamente mantuvieron el peso corporal mientras duró el tratamiento, lo que indica que la formulación de ARNip se toleraba bien y lo que sugiere beneficio terapéutico. La muerte no es un criterio de valoración aceptable en estudios en animales; por lo tanto, se definió un criterio de valoración humano de acuerdo con valores clínicos diarios que fueron una suma de la pérdida de peso, estado corporal, y disensión abdominal. En este modelo ortotópico agresivo, el tiempo hasta la primera eutanasia en el grupo Luc-U/U fue 28 d después de la siembra del tumor con un tiempo medio de supervivencia de 32 d. Por comparación, los tiempos hasta la primera eutanasia y de supervivencia media en los ratones tratados con SNALP PLK1424-2/A se prolongaron significativamente hasta 44 d y 51 d, respectivamente ($p < 0,05$; Figura 29B). Se

observaron prolongaciones similares a los tiempos de supervivencia en estudios repetidos utilizando ratones nu/nu atímicos como hospedadores (Figura 30).

Después se evaluó la extensión de carga tumoral hepática Hep3B al completarse la dosificación con PLK1424-2/A en el día 22 después del implante del tumor (1 día después de la quinta dosis de ARNip). En la autopsia, solamente 2 de 6 ratones tratados con PLK1424-2/A tenían tumores visibles localizados alrededor del sitio de implante celular en el lóbulo hepático, en comparación con la carga tumoral macroscópica extensiva en correspondientes animales de control (Figura 31). Conjuntos de sondas específicas de especie para ARNm de GAPDH humana (hGAPDH) detectaron bajos niveles de esta señal derivada de tumor en 5 de 6 ratones tratados con PLK1424-2/A, que varían de 2 a 6 veces por encima de la señal de fondo de hígado de ratón normal (Figura 29C), lo que indica que el crecimiento del tumor estaba significativamente suprimido pero no completamente erradicado por este régimen de tratamiento.

Para examinar mejor la tolerabilidad de la administración sistémica de ARNip, se realizaron estudios de toxicidad multi-dosis usando el equivalente de ratón PLK773-1/B. La administración repetida de PLK773-1B formulado en SNALP a 2 mg/kg, dos veces a la semana (que refleja el régimen de dosificación terapéutica) no causó cambios significativos en las enzimas hepáticas en suero, recuentos de wbc totales, linfocitos y neutrófilos, cantidades de plaquetas, o parámetros de rbc evaluados después de 15 y 29 días de tratamiento continuo (Figura 32). Estos resultados indicaron que el régimen de dosificación terapéutica establecido en el modelo de tumor ortotópico causó toxicidad hepatocelular mínima y ninguna disfunción significativa de médula ósea del tipo frecuentemente observado con la administración sistémica de fármacos anti-mitóticos de molécula pequeña.

A continuación se evaluó el efecto terapéutico de ARNip KSP2263-U/U formulado en SNALP en tumores hepáticos Neuro2a singénicos. El tiempo medio de supervivencia de ratones que recibieron SNALP Luc-U/U (4 mg/kg, Q3d x5) fue de 20 d en este modelo, en comparación con 28 d en el grupo de tratamiento con KSP2263-U/U (Figura 29D), lo que demuestra eficacia terapéutica con ARNip formulado en SNALP para otra diana de oncología.

Confirmación del silenciamiento de genes tumorales mediado por iARN in vivo

A pesar de demostrar que el 2'OMe ARNip no inducía una respuesta inmune medible en ratones, sigue siendo crítico mostrar que la iARN era el mecanismo principal subyacente a los potentes efectos terapéuticos de estas formulaciones de ARNip para PLK-1 y KSP. Una única administración intravenosa de PLK1424-2/A formulado en SNALP (2 mg/kg) causó una reducción significativa en el ARNm de PLK-1 humana (hPLK-1) derivado de tumor en tumores hep3B hepáticos 24 h después de la administración (45% +/- 6,8% de los niveles de ARNm de hPLK-1 en ratones tratados con PBS; Figura 33A). Se consiguió una reducción similar en la expresión de ARNm de KSP de ratón usando una dosis equivalente de KSP2263-U/U en el modelo de tumor Neuro2a hepático (Figura 33B). En contraste con la expresión de KSP y PLK-1 en tumores, se descubrió que la expresión endógena de estos dos genes en el hígado no proliferativo adyacente era muy baja, por debajo del nivel de detección del ensayo de ADN ramificado empleado en estos estudios. Como la expresión de genes del ciclo celular tales como PLK-1 y KSP está típicamente regulada negativamente cuando la célula sales del ciclo celular (22), cualquier efecto anti-proliferativo no específico inducido por ARNip o el vehículo de suministro causaría una disminución general en su expresión dentro de los tumores. Por lo tanto se confirmó la iARN como el mecanismo responsable del silenciamiento del ARNm in vivo por el método de 5'- RACE PCR. Se amplificó fácilmente un producto de PCR del tamaño previsto a partir de muestras de tumor Hep3B hepático tomadas 24 h después de la administración de SNALP PLK1424-2/A (Figura 33C). La secuencia con oligonucleótidos del producto de PCR de 476 pb de tres ratones individuales confirmó su identidad como el extremo cortado 5' predicho del ARNm de hPLK-1. Este producto de PCR no fue evidente en tumores tomados de ratones tratados con ARNip Luc-U/U o en muestras hepáticas de animales que no albergan tumores. El análisis RACE-PCR también confirmó la inducción específica de escisión del ARNm de KSP mediada por iARN dentro de tumores de animales tratados con KSP2263-U/U (Figura 33D).

5'-RACE-PCR para controlar la duración de la iARN en tumores

Para determinar la duración de iARN activa dentro del tumor, se trató una cohorte de ratones que albergan tumores Hep3B con SNALP PLK1424-2/A (2 mg/kg por administración intravenosa) y se recogieron los tumores 24 h, 48 h, 96 h, 7 d, y 10 d después de la administración para el análisis por 5' RACE-PCR. La escisión activa de ARNm de PLK-1 permaneció potente a las 48 y 96 h y aún fue evidente 7 d después de una única administración de ARNip. Se detectó una señal débil en animales tratados con PLK1424 en el día 10 (Figura 34A). La duración de la iARN determinada por RACE-PCR se correlaciona estrechamente con el nivel de silenciamiento de ARNm de hPLK-1 en estos tumores hepáticos (Figura 34B), lo que proporciona confirmación adicional de que la iARN era el mecanismo principal para las reducciones en el ARNm de PLK-1. Como las especies escindidas de ARNm son inherentemente inestables en el citoplasma celular, puede concluirse que la escisión activa mediada por RISC del ARNm diana persistía durante 7-10 días después de un único tratamiento con ARNip. Esto sugiere que continuaba sucediendo iARN activa dentro del subconjunto de células tumorales a niveles sub-citotóxicos o dentro de una población inicialmente no proliferativa que posteriormente entraba en el ciclo celular y volvía a expresar ARNm de PLK-1.

Actividad anti-tumor mediada por iARN evaluada por histología

Muchos fármacos anti-mitóticos, incluyendo inhibidores de KSP (46) y PLK-1 (47, 48), inducen distintos fenotipos nucleares que reflejan su mecanismo subyacente de acción. Por lo tanto se usó histología convencional como biomarcador para evaluar si el grado de silenciamiento génico mediado por iARN *in vivo* era suficiente para inducir el efecto anti-mitótico deseado en células tumorales. La inhibición de KSP evita la formación del huso bipolar y la segregación del centrosoma, lo que conduce a la formación de huesos monoastrales característicos. Primero se confirmó que el tratamiento de células tumorales con ARNip KSP2263-U/U inducía distinto fenotipo nuclear monoastral *in vitro* (Figura 35). La histología convencional sobre tumores Neuro2a de ratones tratados con KSP2263-U/U reveló cantidades significativas de células tumorales con figuras mitóticas aberrantes típicas de células monoastral y apoptóticas (46) 24 h después de la administración de SNALP (Figura 36A, B). Esta drástica respuesta farmacodinámica al tratamiento con KSP2263-U/U fue dependiente de la dosis con efectos máximos observados a 2 mg/kg de ARNip en base a valores de histología cuantitativa (Figura 36C). Este análisis estimó ~13% de las células tumorales Neuro2a totales con estructuras de cromatina condensada a las 24 h después del tratamiento con ARNip, en comparación con ~3% de células que presentan figuras mitóticas típicas en tumores de control.

El análisis histológico de tumores hepáticos Hep3B de ratones tratados con SNALP PLK1424-2/A también reveló abundantes células tumorales con estructuras de cromatina condensada y figuras mitóticas aberrantes (Figura 37). Estos cambios fenotípicos fueron coherentes con la segregación cromosómica mal regulada y la apoptosis que se induce por inhibición de PLK-1 (47) y estaban en llamativo contraste con las figuras mitóticas típicas evidentes en la histología de tumor de animales tratados con control.

Estos estudios farmacodinámicos moleculares y celulares confirmaron que el grado de silenciamiento mediado por iARN conseguido por una única administración intravenosa de ARNip para PLK o KSP formulado en SNALP fue suficiente para causar disfunción mitótica en una proporción sustancial de células tumorales. Las evaluaciones histológicas de la actividad del fármaco en ambos modelos demostraron que las células "afectadas" estaban distribuidas por todos los tumores establecidos, lo que indica una buena penetración del vehículo de suministro lipídico. Tomados en conjunto, esta batería de ensayos proporcionó evidencias concluyentes de que los potentes efectos terapéuticos de estos ARNip formulados en SNALP, en presencia de una respuesta inmune medible, son el resultado de iARN.

Actividad terapéutica de ARNip formulado en SNALP en tumores subcutáneos

Para expandir la utilidad general de esta tecnología en oncología, se ensayó el rendimiento de esta formulación SNALP dirigida al hígado (26) para el suministro de ARNip a tumores fuera del hígado. Para vehículos que contienen conjugados poli(etileno)glicol lípido (PEG-lípidos) tales como SNALP, puede conseguirse tiempo aumentado de residencia en la sangre y acumulación en el tumor incorporando PEG-lípidos con cadenas alquilo más largas que se asocien de forma más fuerte a la partícula lipídica y proporcionen mayor protección en el compartimiento sanguíneo (49). El remplazo del PEG-lípido C14 (PEG-cDMA) con el análogo C18 PEG-cDSA (50) tuvo el efecto de aumentar significativamente el tiempo en circulación sanguínea de SNALP PLK1424-2/A en ratones si alterar su eficacia terapéutica en tumores hepáticos (Figura 38; supervivencia media de PLK PEG-cDMA = 51 d, PLK PEG-cDSA = 53 d frente a Luc Control PEG-cDMA = 33 d; $p < 0,05$).

A pesar de un tiempo en circulación sanguínea relativamente corto y una rápida distribución al hígado, la administración repetida de SNALP PEG-cDMA que contenía PLK1424-2/A causó inhibición significativa de crecimiento tumoral Hep3B subcutáneo en comparación con controles de tratamiento con ARNip Luc-U/U (Figura 39A). PLK1424-2/A formulado en una SNALP equivalente PEG-cDSA mostró efectos anti-tumorales más potentes, induciendo la regresión de tumores establecidos (~7 mm de diámetro) a través del periodo de dosificación (Figura 39A). Esta diferencia en la actividad se correlacionó con el grado de silenciamiento génico inducido por estos SNALP PLK1424-2/A en tumores subcutáneos (Figura 39B). Como en los modelos de tumor hepático, esto se confirmó como mediado por iARN tanto por RACE-PCR como por histología de tumor. Finalmente, se estableció la respuesta a dosis terapéutica de la formulación PEG-cDSA PLK1424-2/A en el modelo subcutáneo. Fue evidente una inhibición dependiente de dosis del crecimiento tumoral de 0,5 a 3,0 mg/kg de ARNip PLK1424-2/A (Figura 39C). Al nivel de dosis más bajo ensayado, esto representó una dosis cumulativa total de 3 mg/kg de ARNip durante un periodo de 2 semanas.

Discusión

La definición del mecanismo de acción para fármacos basados en ácido nucleico históricamente se ha confundido por la estimulación inmune subyacente u otros efectos no específicos inducidos por el ácido nucleico (51, 52). Esto sigue siendo una preocupación válida en el campo emergente de agentes terapéuticos basados en ARNip (11). La evaluación de la regulación negativa del ARNm diana o proteína es necesaria, pero no suficiente para concluir iARN como mecanismo subyacente ya que estos cambios pueden ser sintomáticos de los efectos fuera de diana inducidos por ARNip. Este experimento sobre el desarrollo de ARNip formulado en SNALP para aplicaciones en oncología describe la metodología usada para confirmar tanto la especificidad como el mecanismo de acción subyacente a la

potente eficacia anti-tumoral mediada por ARNip en modelos preclínicos. Esto implicó una combinación de enfoques: (1) el diseño de formulaciones tanto activas como de control de ARNip sin capacidad aparente de activar una respuesta inmune, excluyendo por lo tanto lo mejor posible la eficacia no específica; (2) la selección de dianas validadas de oncología (PLK-1 y KSP) con efectos anti-tumorales directos y biomarcadores histológicos distintivos de inhibición de diana funcional; (3) el uso de RACE-PCR para confirmar la inducción del producto de escisión de ARNm específico de iARN en células tumorales; y (4) la correlación de estas características de iARN activa con la duración del silenciamiento del ARNm diana en tumores. Este experimento es el primer informe que describe efectos anti-tumores de ARNip para demostrar formalmente la iARN como mecanismo principal de acción. Además, este enfoque para el diseño de estudio preclínico puede generalizarse a otras dianas en oncología y adoptarse fácilmente por los investigadores en el campo de iARN.

Para evaluar el potencial terapéutico del silenciamiento génico en tumores sin confundir los efectos de la estimulación inmune, se diseñaron ARNip 2'OMe modificados que eliminan completamente la actividad inmunoestimuladora de dúplex de ARN no modificados (nativos) cuando se administran en un vehículo de suministro. Está bien establecido que la gran mayoría de los dúplex de ARNip nativos tienen la capacidad inherente de activar la respuesta inmune innata a través de la vía endosómica TLR7 y/o TLR8, particularmente cuando se facilita la captación celular por vehículos de suministro (2, 3, 18, 53). Se ha informado de que dúplex de ARNip desnudos (no formulados) de 21 pb o más largos activan TLR3 de superficie celular en células endoteliales, causando efectos anti-angiogénicos no específicos en modelos de neovascularización corioidea (4). Las consecuencias de la activación inmune por ARNip en modelos de tumor se ilustró recientemente por los potentes efectos anti-tumorales provocados por construcciones de ARNip inmunoestimuladores tanto activas como no dirigidas a través de la activación de funciones efectoras inmunes (15). Los 2'OMe ARNip descritos en este documento no indujeron respuesta medible de citoquinas en ratones. Tampoco hubo inducción del gen IFIT1 inducible IFN en el hígado, que representan el órgano diana principal para estos vehículos de suministro, o dentro de tejidos linfoides secundarios. La expresión de IFIT1 es sensible a la señalización local de IFN dentro de tejidos, y también se induce directamente mediante receptores de ARNbc, incluyendo TLR3, a través de una vía independiente de IFN (54-56). Su medida por lo tanto puede considerarse más ampliamente indicativa de activación inmune mediada por ARNip en comparación con la inducción de citoquinas sistémicas particulares. Tomados juntos, estos resultados indican que el diseño apropiado de 2'OMe ARNip no solamente puede evitar la activación de TLR7/8 endosómico (2, 3, 18, 53), sino también TLR3 (56). Esto probablemente refleja el hecho de que la encapsulación de ARNip dentro de vehículos de suministros tales como SNALP protege de forma eficaz al ARN de la exposición a TLR3 en la superficie celular. Es importante que los investigadores confirmen la anulación completa de una respuesta inmune a sus ARNip seleccionados en el contexto de sus vehículos de suministro y modelo animal preferidos.

Se han propuesto varias estrategias para modificar químicamente ARNip, principalmente con la intención de producir dúplex resistentes a nucleasa (16). Este experimento ilustra que estrategias que incorporan restos de 2'OMe-G, -U, o -A en ambas hebras del dúplex generarán ARNip no inmunoestimuladores. Uno de estos métodos para el diseño de ARNip emplea la alternancia de 2'OMe nucleótidos en la totalidad de ambas hebras del dúplex (57). Santel y colaboradores (58) han ensayado estos 2'OMe ARNip frente a la diana angiogénica CD31 en modelos de tumor usando una formulación lipoplex que transfecta el endotelio vascular. Los efectos anti-tumorales en estos estudios se correlacionaron con reducciones específicas en la expresión de CD31 y la vasculatura tumoral en ausencia aparente de estimulación inmune evidente. Aunque los autores no conformaron la inducción de iARN en sus modelos y solamente observaron IFN- α sistémico 24 h después de la administración de ARNip, el informe representa uno de los poquísimos estudios publicados sobre iARN en oncología para usar construcciones de ARNip químicamente modificado que tienen capacidad inmunoestimuladora mínima prevista. Debe apreciarse que este diseño de ARNip se basa en dúplex de 19 monómeros de extremos romos que, como moléculas desnudas, está previsto que no activen TLR3 (4). Esta suposición tiene que ensayarse formalmente para estos ARNip en lipoplex para asegurar que la formación de complejos de ARNip cortos no posibilita su acoplamiento a TLR3 de superficie celular u otros receptores de ARN.

El silenciamiento dirigido por ARNip puede ofrecer varias ventajas sobre la inhibición funcional por fármacos de molécula pequeña. Por su naturaleza, la iARN es altamente específica y permite la inhibición selectiva de proteínas muy relacionadas en comparación con la promiscuidad relativa de inhibidores de quinasa. Los actuales inhibidores de PLK-1 por ejemplo también inhiben la actividad quinasa PLK-2 y PLK-3 (23, 59), creando algunas preocupaciones sobre que la inhibición concomitante de estos miembros de la familia pueda tener efectos opuestos en el control de la división celular (60). La respuesta biológica a la reducción de proteína por iARN también puede diferir de su inhibición funcional por moléculas pequeñas, por ejemplo, la pérdida de funcionalidad tanto quinasa como caja polo-box tras silenciamiento génico de PLK-1 (61). La duración del efecto del fármaco que puede conseguirse con ARNip es otra ventaja atractiva. Una vez establecida la iARN dentro de las células de mamífero, el silenciamiento génico puede persistir durante muchos días, debido a la estabilidad relativa de RISC activado en presencia de su ARNm complementario (26, 62). Por lo tanto, el mantenimiento de la actividad del fármaco para un agente terapéutico de ARNip está desacoplado de la necesidad de mantener una concentración eficaz de fármaco en la sangre. Se ha descubierto que la iARN activa en nuestros modelos de tumor persistía durante hasta 10 días en base a la detección del producto de escisión de ARNm específico por RACE-PCR. De forma interesante, esta duración del efecto fue sustancialmente más corta que la observada en estudios comparables dirigidos a la

expresión de ApoB en el hígado de ratones sanos en que el silenciamiento al nivel de ARNm se resuelve lentamente entre 14 y 28 días después de la administración de ARNip (26). Creemos que la atenuación de la iARN en el tumor resulta muy probablemente de la eliminación eficaz de células tumorales PLK-1 silenciadas y de la dilución del RISC activado a través de la proliferación de células que reciben dosis sub-letales de ARNip para PLK-1 (62).

Este experimento demuestra que la administración sistémica de ARNip formulado en SNALP puede activar la escisión mediada por iARN de ARNm dentro de tumores sólidos, el silenciamiento de la expresión de dianas a una magnitud suficiente para inducir la alteración mitótica y la apoptosis de células tumorales. Este efecto específico de fármaco se traduce en robusta actividad anti-cancerosa terapéutica en modelos de HCC humano. La inhibición significativa del crecimiento tumoral, que se correlaciona con mejoras marcadas en los signos clínicos, finalmente condujo a aumentos significativos en los tiempos de supervivencia.

El inhibidor multi-quinasa Sorafenib se ha aprobado recientemente para el tratamiento de HCC inoperable en base a los datos limitados de fase III (63) y es probable que Sorafenib llegue a ser norma asistencial para esta indicación. Como resultado, existe utilidad en el uso de ARNip formulado en SNALP en combinación con fármacos de molécula pequeña. De hecho, nuestros estudios indican que una combinación de Sorafenib y SNALP para PLK-1 se tolera bien en ratones y muestra signos prometedores de actividad en modelos de tumor.

Las opciones actuales de tratamiento se limitan a pacientes con cáncer de hígado primario o enfermedad hepática metastásica y los pronósticos siguen siendo malos. El desarrollo clínico de ARNip terapéuticos dirigidos a genes clave en el desarrollo del cáncer, tales como PLK-1 y KSP, acoplados con un vehículo de suministro sistémico capaz de abordar tumores hepáticos y diseminados, ofrece una oportunidad excitante para esta importante necesidad médica no satisfecha.

Métodos

ARNip. Se seleccionaron secuencias de ARNip dirigidas a PLK-1 humana (Nº de acceso a Genbank NM_005030) usando un algoritmo convencional de diseño de ARNip (40, 64). Las secuencias diana de los ARNip para PLK-1 se enumeran en la Tabla 7. Todos los ARNip se sintetizaron como oligonucleótidos por Integrated DNA Technologies y se recibieron como ARN desalado, desprotegido. La integridad de los dúplex hibridados se confirmó por PAGE al 20%. Se formularon ARNip en SNALP compuestas por colesterol sintético (Sigma), DSPC (1,2-diesteróil-sn-glicero-3-fosfolina; Avanti Polar Lipids), PEG-cDMA (3-N-(metoxi poli(etilenglicol)2000)carbamoil-1,2-dimirestiloil-propilamina), y DLinDMA (1,2-dilinoileiloxi-3-(N,N-dimetil)aminopropano) como se ha descrito previamente (26). Las formulaciones usadas para estudios *in vivo* comprendían una proporción másica final lípido:ARNip de 9:1. En los experimentos indicados, se sustituyó PEG-cDMA a concentraciones equimolares con el análogo C18 PEG-cDSA (50). Todas las partículas lipídicas estabilizadas se dializaron en PBS antes de su uso y fueron estables como preparación húmeda almacenada a 4°C durante más de 6 meses.

Tabla 7. Secuencias de ARNip dirigidas a PLK-1 humana.

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID Nº
126	GGUCCUAGUGGACCCACGCUU	235
272	AGCCGCACCAGAGGGAGAAUU	236
273	GCCGCACCAGAGGGAGAAUU	237
363	GGACAACGACUUCGUGUUCUU	238
412	CUCCUGGAGCUGCACAAGAUU	239
450	GCCUGAGGCCCGAUACUACUU	240
498	CCUGCACCGAAACCGAGUUUU	241
618	GAGGAAGAAGACCCUGUGUUU	242
627	GACCCUGUGUGGGACUCCUUU	243
629	CCCUGUGUGGGACUCCUAAUU	244
630	CCUGUGUGGGACUCCUAAUUU	245
693	GGUGGAUGUGUGGUCCAUUUU	246
694	GUGGAUGUGUGGUCCAUGUU	247
736	GUGGGCAAACCAUUUUUGUU	248
744	ACCACUUUUUGAGACUUCUUU	249
745	CCACUUUUUGAGACUUCUUUU	250
772	GAGACCUACCUCCGGAUCAUU	251
773	AGACCUACCUCCGGAUCAUU	218
776	CCUACCUCCGGAUCAAGAAUU	252
780	CCUCCGGAUCAAGAAGAAUUU	253
832	GCCGCCUCCCUCAUCCAGAUU	254
837	CUCCCUCAUCCAGAAGAUGUU	255
1137	GCAGCUGCACAGUGUCAUUUU	256
1195	GAGGCUGAGGAUCCUGCCUUU	257

ARNip	Hebra con sentido (5' → 3')	SEC ID Nº
1229	GGGUCAGCAAGUGGGUGGAUU	258
1232	UCAGCAAGUGGGUGGACUAAU	259
1233	CAGCAAGUGGGUGGACUAAUU	260
1242	GGUGGACUAAUUCGACAAUU	261
1319	CACGCCUCAUCCUCUACAAUU	262
1321	CGCCUCAUCCUCUACAAUGUU	263
1347	CAGCCUGCAGUACAUAGAGUU	264
1404	UCCCAACUCCUUGAUGAAGUU	265
1409	ACUCCUUGAUGAAGAAGAUUU	266
1424	AGAUCACCCUCCUAAAUAUU	211
1457	UGAGCGAGCACUUGCUGAAUU	267
1550	CCCGCAGCGCCAUCUCCUUU	268
1556	GCGCCAUCUCCUGCACCUUU	269
1577	GCAACGGCAGCGUGCAGAUUU	270
1580	ACGGCAGCGUGCAGAUCAAUU	271
1620	GCUCAUCUUGUGCCACUGUU	272
1658	UCGACGAGAAGCGGGACUUUU	273

El número bajo "ARNip" en la Tabla 7 se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030. En ciertas realizaciones descritas en este documento, la hebra con sentido comprende nucleótidos modificados tales como 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA).

Cultivos celulares. Las líneas celulares Hep3B, HepG2, HT29, LS174T, y Neuro2a se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) y se cultivaron en el medio basal recomendado con FBS inactivado por calor al 10% y penicilina-estreptomycin al 1%. Para estudios de tumor *in vivo*, se cultivaron células Hep3B o Neuro2a en matraces T175, se recogieron y lavaron una vez en PBS antes del implante. Para ensayos de actividad de ARNip *in vitro*, las líneas celulares se cultivaron en placas de 96 pocillos en presencia de ARNip formulado en SNALP. La viabilidad celular se evaluó después de 72 h usando el colorante de resazurina CellTiter Blue (Promega Corp). Se evaluó la correspondiente actividad de silenciamiento del ARNm de PLK-1 o KSP en placas duplicadas a las 24 h por el ensayo de ADNb (Panomics Inc.). El nivel de actividad enzimática de Caspasa 3 y 7 en células tratadas con ARNip se evaluó usando el reactivo Apo-ONE (Promega Corp.) de sustrato fluorescente Caspasa 3/7 (Z-DEVD)2-Rodamina 110.

Ensayos de estimulación inmune in vitro. Se generaron cultivos de células dendríticas Flt3L de ratón como se ha descrito previamente (65). En resumen, se recogió médula ósea de ratones Balb/C en medio completo (RPMI 1640, FBS al 10%, penicilina/estreptomycin al 1%, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, HEPES 25 mM, 2-mercaptoetanol 50 uM), se pasó a través de un tamiz de 70 micrómetros y se resuspendió a 2x10⁶ células/ml en medio completo suplementado con 100 ng/ml de Flt3L murino (Peprotech). Las células se sembraron en placas de 6 pocillos y se añadió 1 ml de medio Flt3L fresco cada tres días. En el día 9 de cultivo, se sembraron las células adherentes en placas de 96 pocillos a una concentración de 2 x 10⁵ células/pocillo. Los ARNip formulados se diluyeron en PBS y se añadieron a las células durante 24 h antes de ensayar los sobrenadantes para citoquinas por ELISA.

Ensayos de estimulación inmune in vivo. Todos los estudios en animales se realizaron en Protiva Biotherapeutics de acuerdo con las directrices del Canadian Council on Animal Care y después de la aprobación del protocolo por el Institutional Animal Care and Use Committee. Se obtuvieron ratones Balb/C de 6-8 semanas de edad de Harlan y se sometieron a un periodo de aclimatación de dos semanas antes de su uso. Se administró a los ratones ARNip formulado en SNALP (2 mg/kg) en PBS mediante inyección intravenosa convencional en la vena lateral de la cola. Se recogió sangre por punción cardíaca y se procesó como plasma para el análisis de citoquinas. Se recogieron el hígado y el bazo en RNALater (Sigma Co.) para el análisis de ARNm de IFIT1.

Modelos de tumor intrahepático. Se establecieron tumores hepáticos en ratones por inyección intrahepática directa de células tumorales Hep3B o Neuro2a (45). Se usaron ratones scid/beige hembra (Charles River Laboratories) y ratones A/J macho (Jackson Laboratories) como hospedadores para los tumores Hep3B y Neuro2a, respectivamente. Los animales recibieron Anafen por inyección SC inmediatamente antes de la cirugía. Los ratones individuales se anestesiaron por inhalación de gas isoflurano y se les aplicó lubricación ocular para evitar un secado excesivo de los ojos. Mientras se mantenían en anestesia con gas, se hizo una única incisión de 1,5 cm a través de la línea media por debajo del esternón y se exteriorizó el lóbulo hepático lateral izquierdo. Se inyectaron 1x10⁶ células Hep3B o 1x10⁵ células Neuro2a suspendidas en 25 µl de PBS lentamente en el lóbulo a un ángulo llano usando una jeringa Hamilton y aguja 30G. Después se aplicó un hisopo a la herida perforada para detener cualquier

hemorragia antes de suturar. Se dejó que los ratones se recuperaran de la anestesia en una jaula estéril y se controlaron exhaustivamente durante 2-4 h antes de devolverse al alojamiento convencional.

De 8 a 11 días después del implante del tumor, los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento. Las formulaciones de SNALP ARNip o control con vehículo PBS se administraron por inyección intravenosa convencional mediante la vena lateral de la cola, calculada en una base de mg de ARNip/kg de acuerdo con los pesos de los animales individuales (volumen de inyección de 10 ml/kg). Después se controlaron los pesos corporales mientras duró el estudio como un indicador del desarrollo de carga tumoral y tolerabilidad del tratamiento. Para estudios de eficacia, se determinaron criterios de valoración humanos definidos como un equivalente para la supervivencia. Las evaluaciones se hicieron por técnicos veterinarios cualificados en base a una combinación de signos clínicos, pérdida de peso, y distensión abdominal para definir el día del sacrificio debido a la carga tumoral.

Modelos de tumor subcutáneo. Se establecieron tumores Hep3B en ratones scid/beige hembra por inyección subcutánea de 3×10^6 células en 50 μ l de PBS en el costado posterior izquierdo. Los ratones se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento 10-17 días después de la siembra cuando los tumores llegaron a ser palpables. Las formulaciones de SNALP ARNip se administraron como se ha descrito anteriormente. Los tumores se midieron en 2 dimensiones (anchura x longitud) para evaluar el crecimiento del tumor usando calibres digitales. El volumen del tumor se calculó usando la ecuación $a \times b \times b / 2$ donde a y b = diámetros más grande y más pequeño, respectivamente, y se expresó como media de grupo $\pm$ DT.

Medición de ARNm de PLK-1 y GAPDH humanas en tejidos tumorales. Los tumores se recogieron directamente en RNALater y se almacenaron a 4°C hasta el procesamiento. Se homogeneizaron 100 mg de tejido tumoral en solución de tejido y lisis (EpiCentre Biotechnologies) que contenía 50 mg/ml de proteinasa K (EpiCentre) en un homogeneizador tisular Fastprep seguido de incubación en un baño de agua a 65°C durante 15 min y se centrifugaron para aclarar los lisados. El análisis del ARNm de la Figura 33B se realizó sobre ARN purificado aislado de acuerdo con el protocolo de 5'-RACE-PCR. Se midió el ARNm de PLK-1 y GAPDH humanas en lisados tumorales por el ensayo de ADNb QuantiGene (Panomics) según las instrucciones del fabricante (Quantigene 1.0 Manual). Se diseñaron conjuntos de sondas de PLK-1 (NM_005030) y GAPDH (NM_002046) específicas de ser humano por Panomics y demostraron tener reactividad cruzada mínima con el ARNm equivalente de ratón. Los datos se expresaron como proporción media de PLK-1:GAPDH $\pm$ DT de animales individuales. La carga tumoral se evaluó homogeneizando el hígado completo de ratones que albergaban tumores y midiendo la señal hGAPDH total (RLU) dentro del hígado. Los valores se expresaron como RLU de hGAPDH/mg de hígado total.

Medición de ARNm de IFIT1 en tejidos de ratón. Se procesaron el hígado y el bazo murino para el ensayo de ADNc para cuantificar el ARNm de IFIT1 como se ha descrito anteriormente. El conjunto de sondas de IFIT1 era específico para el ARNm de IFIT1 de ratón (posiciones 4-499 de NM_008331) y el conjunto de sondas de GAPDH era específico para el ARNm de GAPDH de ratón (posiciones 9-319 de NM_008084). Los datos se muestran como la proporción de unidades relativas de luz (RLU) de IFIT1 a RLU de GAPDH.

Amplificación rápida mediada por ARN ligasa 5' de extremos de ADNc (5' RLM RACE). Se aisló el ARN total de células cultivadas *in vitro* por lisis directa en TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para muestras de tumor *in vivo*, los tejidos se recogieron en RNALater (Sigma Co.) y se almacenaron a 4°C durante al menos 24 h antes del procesamiento. Se homogeneizaron 30 mg de tejido tumoral en 1 ml de TRIZOL, después se procesaron para aislar el ARN total. La calidad del ARN se confirmó por electroforesis en gel (agarosa TBE al 1%). Se realizó 5' RLM RACE de acuerdo con el manual de Invitrogen GeneRacer con modificaciones. Se diseñaron cebadores usando el software Primer 3. Se mezclaron 10 μ g de ARN total con 1,3 ng de adaptador de ARN GeneRacer (5'-CGACUGGAGCACGAGGACACUGACAUGGACUGAAGGAGUAGAAA-3'; SEC ID N° 274), se calentaron a 65°C durante 5 min y se enfriaron rápidamente en hielo antes del ligamiento. El ligamiento del ARN se realizó a 37°C durante 1 h en tampón de ligasa 1x, 30 U de RNasa-Out (Invitrogen) y 30 U de ARN ligasa (Ambion Inc, Austin, TX). Las muestras después se purificaron por diafiltración usando filtros de 100 micrómetros según las instrucciones del fabricante para ácidos nucleicos (Millipore Inc). Se transcribieron de forma inversa 10 μ l del producto de ligamiento de ARN usando Superscript III (Invitrogen) y un cebador específico de PLK-1 (5'-GGACAAGGCTGTAGAACCCACAC-3'; SEC ID N° 275) diseñado cadena abajo del sitio de corte predicho del ARNip PLK1424. La transcripción inversa se realizó a 55°C durante 50 min seguido de inactivación a 70°C durante 15 min y enfriamiento rápido en hielo. La 5' RLM RACE PCR se realizó usando cebadores directo (GR5) e inverso (PLK1424rev) en el adaptador GeneRacer y el extremo 3' del ARNm de PLK-1, respectivamente, para abarcar el sitio de corte predicho de PLK1424. Las secuencias cebadoras de PCR fueron las siguientes: GR5 - 5'-CGACTGGAGCACGAGGACACTGA-3' (SEC ID N° 276); y PLK1424rev - 5'-CCAGATGCAGGTGGGAGTGAGGA-3' (SEC ID N° 277). La PCR se realizó usando un BIO-RAD iCycler usando condiciones de PCR de contacto de 94°C durante 2 min (1 ciclo), 94°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 min (5 ciclos), 94°C durante 30 segundos y 70°C durante 1 min (5 ciclos), 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 min (25 ciclos), y 68°C durante 10 min (1 ciclo). Los productos de PCR se procesaron en un gel de TBE Agarosa 1000 al 2% (Invitrogen) y se tiñeron con 1 μ g/ml de bromuro de etidio. La identidad de los productos de PCR se confirmó por secuenciación directa de los productos purificados en gel usando los siguientes cebadores de secuenciación: GeneRacer 5' Seq - 5'-ACTGGAGCACGAGGACAC-3' (SEC ID N° 278); y PLK1424 3' Seq - 5'-GAGACGGGCAGGGATATAG-3' (SEC ID N° 279). Se emplearon condiciones de ensayo y diseño de cebadores

similares para amplificar el producto escindido del ARNm de KSP por ARNip KSP2263 usando los siguientes cebadores únicos: cebador de ADNc específico de KSP 5'-GCTGCTCTCGTGGTTCAGTTCTC-3' (SEC ID N° 280), cebador RACE KSPrev 5'-GCCCAACTACTGCTTAAGTGGCAAA-3' (SEC ID N° 281), y cebador de secuenciación de KSP 5'-TGGGTTTCCTTTATTGTCTT-3' (SEC ID N° 282).

Histología. Se recogieron los tumores de los ratones 24 h después de la administración de ARNip y se fijaron directamente en formalina tamponada al 10%. Después se procesaron los tejidos como secciones tisulares incrustadas en parafina y se tiñeron con hematoxilina y eosina usando técnicas histológicas convencionales. El análisis cuantitativo de las secciones teñidas se realizó contando la cantidad de células mitóticas/apoptóticas que presentaban estructuras de cromatina condensada como un porcentaje de las células tumorales totales. Los valores para cada tumor se derivaron de la media de 10 campos visuales a aumento 400x.

ELISA de citoquinas. Todas las citoquinas se cuantificaron usando kits de ELISA tipo sándwich. Éstas fueron interferón- α de ratón (PBL Biomedical; Piscataway, NJ) e IL-6 humana y de ratón (BD Biosciences; San Diego, CA).

Secuencias de ARNip de ApoB-1. Se usaron las siguientes secuencias de ARNip de ApoB-1 (5'-3') en los experimentos mostrados en la Figura 25: Con sentido - GUCAUCACACUGAAUACCAAU (SEC ID N° 283); 2'OMe con sentido - GUCAUCACACUGAAUACCAAU (SEC ID N° 284); Antisentido (AS) - AUUGGUAUUCAGUGUGAUGACAC (SEC ID N° 285); 2'OMe AS - AUUGGUAUUCAGUGUGAUGAUGACAC (SEC ID N° 286). Los 2'OMe nucleótidos se indican en negrita y subrayados.

Análisis estadístico. Se realizó una comparación de los tiempos de supervivencia en diagramas de Kaplan-Meier por el ensayo de rango Log (Mantel Cox). Las diferencias se consideraron significativas para valores P menores de 0,05.

Referencias

- (1) Elbashir, S.M. et al. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
- (2) Judge, A.D. et al. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 23: 457-462.
- (3) Hornung, V. et al. 2005. Sequence-specific potent induction of IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* 11: 263-270.
- (4) Kleinman, M.E. et al. 2008. Sequence and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 452:591-597.
- (5) Hornung, V. et al. 2006. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. *Science* 314: 994-997.
- (6) Marques, J.T. et al. 2006. A structural basis for discriminating between self and nonself double-stranded RNAs in mammalian cells. *Nat Biotechnol* 24: 559-565.
- (7) Krieg, A.M. 2006. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov* 5: 471-484.
- (8) von Marschall, Z. et al. 2003. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 95:437-448.
- (9) Lanuti, M. et al. 2000. Cationic lipid:bacterial DNA complexes elicit adaptive cellular immunity in murine intraperitoneal tumor models. *Cancer Res* 60: 2955-2963.
- (10) Buhtoiarov, I.N., Lum, H.D., Berke, G., Sondel, P.M., and Rakhmievich, A.L. 2006. Synergistic activation of macrophages via CD40 and TLR9 results in T cell independent antitumor effects. *J Immunol* 176: 309-318.
- (11) Judge, A., y MacLachlan, I. 2008. Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Hum Gene Ther* 19: 111-124.
- (12) Michie, H.R. et al. 1988. Detection of Circulating Tumor Necrosis Factor after Endotoxin Administration. *N. Engl. J. Med.* 318: 1481-1486.
- (13) Stevenson, H.C. et al. 1985. A phase I evaluation of poly(I,C)-LC in cancer patients. *J Biol Response Mod.* 4: 650-655.
- (14) Schlee, M., Barchet, W., Hornung, V., y Hartmann, G. 2007. Beyond double-stranded RNA-type I IFN induction by 3pRNA and other viral nucleic acids. *Curr Top Microbiol Immunol* 316: 207-230.
- (15) Poeck, H. et al. 2008. 5'-triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma. *Nat Med.* 14: 1256-1263.
- (16) Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8: 570-579.
- (17) Morrissey, D.V. et al. 2005. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 23: 1002-1007.
- (18) Judge, A.D., Bola, G., Lee, A.C., y MacLachlan, I. 2006. Design of non-inflammatory synthetic siRNA mediating potent gene silencing in vivo. *Mol Ther* 13: 494-505.
- (19) Knight, S.D., y Parrish, C.A. 2008. Recent progress in the identification and clinical evaluation of inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Curr Top Med Chem* 8: 888-904.
- (20) Strebhardt, K., and Ullrich, A. 2006. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6: 321-330.

- (21) Tao, W. et al. 2005. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* 8: 49-59.
- (22) Barr, F.A., Sillje, H.H., and Nigg, E.A. 2004. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:429-440.
- 5 (23) Steegmaier, M. et al. 2007. BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol* 17: 316-322.
- (24) Liu, X., y Erikson, R.L. 2003. Polo-like kinase (Plk)1 depletion induces apoptosis in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 5789-5794.
- (25) Spankuch, B., Kurunci-Csacsko, E., Kaufmann, M., y Strebhardt, K. 2007. Rational combinations of siRNAs targeting Plk1 with breast cancer drugs. *Oncogene* 26: 5793-5807.
- 10 (26) Zimmermann, T.S. et al. 2006. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 441: 111-114.
- (27) de Fougères, A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J., y Lieberman, J. 2007. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 6: 443-453.
- (28) Behlke, M.A. 2006. Progress towards in vivo use of siRNAs. *Mol Ther* 13: 644-670.
- 15 (29) Urban-Klein, B., Werth, S., Abuharheid, S., Czubyko, F., y Aigner, A. 2005. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* 12: 461-466.
- (30) Schifferers R.M et al. 2004. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res* 32: e149.
- (31) Heidel, J.D. et al. 2007. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc Natl Acad Sci US A* 104: 5715-5721.
- 20 (32) Santel, A. et al. 2006. A novel siRNA-lipoplex technology for RNA interference in the mouse vascular endothelium. *Gene Ther* 13: 1222-1234.
- (33) Mayer, L., Bally, M., Cullis, P., Wilson, S., y Emerman, J. 1990. Comparison of free and liposome encapsulated doxorubicin tumor drug uptake and antitumor efficacy in the SC115 murine mammary tumor. *Cancer Letters* 53: 183-190.
- 25 (34) Seymour, L.W. 1992. Passive tumor targeting of soluble macromolecules and drug conjugates. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 9: 135-187.
- (35) Chono, S., Li, S.D., Conwell, C.C., y Huang, L. 2008. An efficient and low immunostimulatory nanoparticle formulation for systemic siRNA delivery to the tumor. *J Control Release* 131: 64-69.
- 30 (36) Peer, D., Park, E.J., Morishita, Y., Carman, C.V., y Shimaoka, M. 2008. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science* 319: 627-630.
- (37) Robbins, M. et al. 2008. Misinterpreting the therapeutic effects of siRNA caused by immune stimulation. *Hum Gene Ther*. PMID 18713023.
- (38) Weil, D., Garcon, L., Harper, M., Dumenil, D., Dautry, F., y Kress, M. 2002. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. *Biotechniques* 33: 1244-1248.
- 35 (39) Soutschek, J. et al. 2004. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 432: 173-178.
- (40) Elbashir, S.M., Lendeckel, W., y Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.
- 40 (41) Matranga, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., y Zamore, P.D. 2005. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123: 607-620.
- (42) Leuschner, P.J., Ameres, S.L., Kueng, S., y Martinez, J. 2006. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 7: 314-320.
- (43) Prakash, T. et al. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J. Med. Chem* 48: 4247-4253.
- 45 (44) Chiu, Y., and Rana, T. 2003. siRNA function in RNAi: A chemical modification analysis. *RNA* 9: 1034-1048.
- (45) Yao, X. et al. 2003. A novel orthotopic tumor model to study growth factors and oncogenes in hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res* 9: 2719-2726.
- (46) Sakowitz, R. et al. 2004. Antitumor activity of kinesin inhibitor. *Cancer Research* 64: 3276-3280.
- 50 (47) Lenart, P. et al. 2007. The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr Biol* 17: 304-315.
- (48) Spankuch-Schmitt, B., Bereiter-Hahn, J., Kaufmann, M., y Strebhardt, K. 2002. Effect of RNA silencing of polo-like kinase-1 (PLK1) on apoptosis and spindle formation in human cancer cells. *JNatl Cancer Inst* 94: 1863-1877.
- 55 (49) Ambegia, E. et al. 2005. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. *Biochimica et Biophysica Acta* 1669: 155-163.
- (50) Heyes, J., Hall, K., Tailor, V., Lenz, R., y MacLachlan, I. 2006. Synthesis and characterisation of novel poly(ethylene glycol)-lipid conjugates suitable for use in drug delivery. *Journal of Controlled Release* 112: 280-290.
- 60 (51) Krieg, A.M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol* 20: 709-760.
- (52) Castro, J.E. et al. 2006. Thymidine-phosphorothioate oligonucleotides induce activation and apoptosis of CLL cells independently of CpG motifs or BCL-2 gene interference. *Leukemia* 20: 680-688.
- (53) Diebold, S.S. et al. 2006. Nucleic acid agonists for Toll-like receptor 7 are defined by the presence of uridine ribonucleotides. *Eur J Immunol* 36: 3256-3267.
- 65 (54) Der, S.D., Zhou, A., Williams, B.R., y Silverman, R.H. 1998. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci US A* 95: 15623-15628.

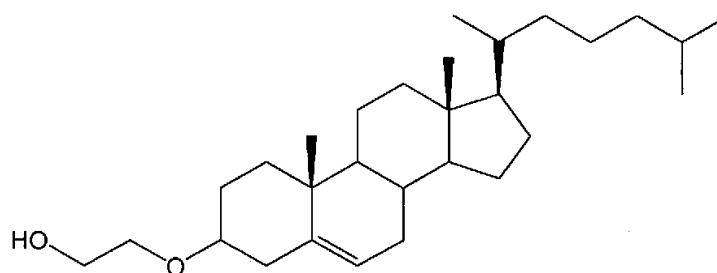
- (55) Geiss, G. et al. 2001. A comprehensive view of regulation of gene expression by double-stranded RNA-mediated cell signaling. *J Biol Chem* 276: 30178-30182.
- (56) Sarkar, S.N., Smith, H.L., Rowe, T.M., y Sen, G.C. 2003. Double-stranded RNA signaling by Toll-like receptor 3 requires specific tyrosine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 278: 4393-4396.
- (57) Czauderna, F. et al. 2003. Structural variations and stabilising modifications of synthetic siRNAs in mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 31: 2705-2716.
- (58) Santel, A. et al. 2006. RNA interference in the mouse vascular endothelium by systemic administration of siRNA-lipoplexes for cancer therapy. *Gene Ther* 13: 1360-1370.
- (59) Johnson, E.F., Stewart, K.D., Woods, K.W., Giranda, V.L., y Luo, Y. 2007. Pharmacological and functional comparison of the polo-like kinase family: insight into inhibitor and substrate specificity. *Biochemistry* 46: 9551-9563.
- (60) Malumbres, M., y Barbacid, M. 2007. Cell cycle kinases in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 17: 60-65.
- (61) McInnes, C. et al. 2006. Inhibitors of Polo-like kinase reveal roles in spindle-pole maintenance. *Nat Chem Biol* 2: 608-617.
- (62) Bartlett, D.W., y Davis, M.E. 2006. Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging. *Nucleic Acids Res* 34: 322-333.
- (63) Llovet, J.M., y Bruix, J. 2008. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008. *J Hepatol* 48 Suppl 1:S20-37.
- (64) Schwarz, D.S. et al. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115: 119-208.
- (65) Gilliet, M. et al. 2002. The development of murine plasmacytoid dendritic cell precursors is differentially regulated by FLT3-ligand and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 195: 953-958.

Experimento 16. Síntesis de colesteril-2'-hidroxietil éter.

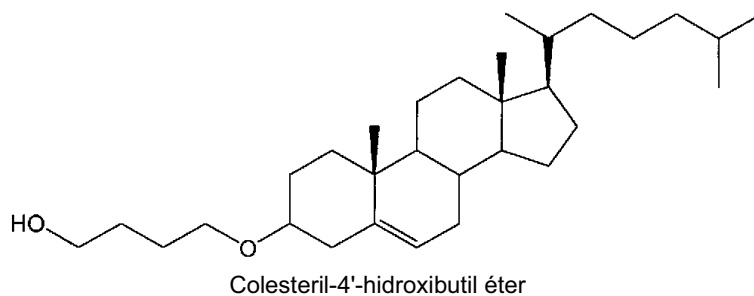
Etapa 1: Se cerró herméticamente un matraz de fondo redondo de 250 ml que contenía colesterol (5,0 g, 12,9 mmol) y una barra de agitación y se enjuagó con nitrógeno. Se pesó cloruro de toluenosulfonilo (5,0 g, 26,2 mmol) en un matraz de fondo redondo de 100 ml diferente, también cerrado herméticamente y enjuagado con nitrógeno. Se suministró piridina anhidra (2 x 50 ml) a cada matraz. La solución de cloruro de toluenosulfonilo después se transfirió, mediante una cánula, al matraz de 250 ml, y la reacción se agitó durante una noche. La piridina se retiró por evaporación rotatoria, y se añadió metanol (80 ml) al residuo. Esto después se agitó durante 1 hora hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. La suspensión se filtró, se lavó con acetonitrilo (50 ml), y se secó al vacío para producir tosilato de colesterilo en forma de un sólido blanco esponjoso (6,0 g, 86%).

Etapa 2: Se añadieron tosilato de colesterilo (2,0 g, 3,7 mmol), 1,4-dioxano (50 ml), y etilenglicol (4,6 g, 74 mmol) se añadieron a un matraz de 100 ml que contenía una barra de agitación. El matraz se equipó con un condensador, y se calentó a reflujo durante una noche. El dioxano después se retiró por evaporación rotatoria, y la mezcla de reacción se suspendió en agua (100 ml). La solución se transfirió a un embudo de separación y se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (2 x 150 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, y el disolvente se retiró. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (acetona/hexano al 5%) para producir el producto en forma de un sólido blanco (1,1 g, 69%).

Las estructuras de los derivados de colesterol colesteril-2'-hidroxietil éter y colesteril-4'-hidroxibutil éter son las siguientes:



Colesteril-2'-hidroxietil éter



Experimento 17. Moléculas ejemplares de ARNia dirigidas a PLK-1.

La Tabla 8 proporciona ejemplos no limitantes de moléculas de ARNia que son adecuadas para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1. El primer conjunto de moléculas de ARNia comprende la secuencia de hebra antisentido del ARNip PLK1424 (SEC ID N° 2). El segundo conjunto de moléculas de ARNia comprende la secuencia de hebra antisentido del ARNip PLK773 (SEC ID N° 4).

El saliente antisentido 5' puede contener uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no dirigidos (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", etc.). Preferiblemente, el saliente antisentido 5' contiene dos nucleótidos no dirigidos. El saliente antisentido 3' puede contener uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no dirigidos. Las moléculas de ARNia pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, por ejemplo, en la región bicatenaria (dúplex) y/o en los salientes antisentido. Se describen en este documento ejemplos de nucleótidos modificados e incluyen 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). Las moléculas de ARNia pueden comprender adicionalmente uno de los sistemas de vehículo descritos en este documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico) y encontrar utilidad en el tratamiento de cánceres tales como cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular).

Tabla 8. Dúplex de ARNia que comprenden polinucleótidos de ARN con sentido y antisentido de PLK-1.

ARNia	Secuencia de ARNia de PLK-1	
PLK1424 (12 pb/1)	5'-CCCUCCUUAAAU-3'	(SEC ID N° 287)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (12 pb/2)	5'-ACCCUCCUUAAA-3'	(SEC ID N° 288)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (12 pb/3)	5'-CACCCUCCUUAA-3'	(SEC ID N° 289)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (13 pb/1)	5'-ACCCUCCUUAAAU-3'	(SEC ID N° 290)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (13 pb/2)	5'-CACCCUCCUUAAA-3'	(SEC ID N° 291)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (13 pb/3)	5'-UCACCCUCCUUAA-3'	(SEC ID N° 292)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (14 pb/1)	5'-CACCCUCCUUAAAU-3'	(SEC ID N° 293)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (14 pb/2)	5'-UCACCCUCCUUAAA-3'	(SEC ID N° 294)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (14 pb/3)	5'-AUCACCCUCCUUAA-3'	(SEC ID N° 295)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (15 pb/1)	5'-UCACCCUCCUUAAAU-3'	(SEC ID N° 296)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (15 pb/2)	5'-AUCACCCUCCUUAAA-3'	(SEC ID N° 297)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (15 pb/3)	5'-GAUCACCCUCCUUAA-3'	(SEC ID N° 298)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (16 pb/1)	5'-AUCACCCUCCUUAAAU-3'	(SEC ID N° 299)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (16 pb/2)	5'-GAUCACCCUCCUUAAA-3'	(SEC ID N° 300)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK1424 (17 pb)	5'-GAUCACCCUCCUUAAAU-3'	(SEC ID N° 301)
	3'-UCUAGUGGGAGGAAUUUUAU-5'	(SEC ID N° 2)
PLK773 (12 pb/1)	5'-ACCUCCGGAUCA-3'	(SEC ID N° 302)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)

ARNia	Secuencia de ARNia de PLK-1	
PLK773 (12 pb/2)	5'-UACCUCCGGAUC-3'	(SEC ID N° 303)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (12 pb/3)	5'-CUACCUCCGGAU-3'	(SEC ID N° 304)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (13 pb/1)	5'-UACCUCCGGAUCA-3'	(SEC ID N° 305)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (13 pb/2)	5'-CUACCUCCGGAUC-3'	(SEC ID N° 306)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (13 pb/3)	5'-CCUACCUCCGGAU-3'	(SEC ID N° 307)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (14 pb/1)	5'-CUACCUCCGGAUCA-3'	(SEC ID N° 308)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (14 pb/2)	5'-CCUACCUCCGGAUC-3'	(SEC ID N° 309)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (14 pb/3)	5'-ACCUACCUCCGGAU-3'	(SEC ID N° 310)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (15 pb/1)	5'-CCUACCUCCGGAUCA-3'	(SEC ID N° 311)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (15 pb/2)	5'-ACCUACCUCCGGAUC-3'	(SEC ID N° 312)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (15 pb/3)	5'-GACCUACCUCCGGAU-3'	(SEC ID N° 313)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (16 pb/1)	5'-ACCUACCUCCGGAUCA-3'	(SEC ID N° 314)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (16 pb/2)	5'-GACCUACCUCCGGAUC-3'	(SEC ID N° 315)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)
PLK773 (17 pb)	5'-GACCUACCUCCGGAUCA-3'	(SEC ID N° 316)
	3'-UCUGGAUGGAGGCCUAGUU-5'	(SEC ID N° 4)

Experimento 18. Moléculas ejemplares de miARN dirigidas a PLK-1.

- 5 La Tabla 9 proporciona ejemplos no limitantes de moléculas de miARN que son adecuadas para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1. Las moléculas de miARN descritas en este documento pueden comprender uno o más nucleótidos modificados. Se describen en este documento ejemplos de nucleótidos modificados e incluyen 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA). Los extremos 5' y/o 3' de la
- 10 secuencia de miARN pueden contener uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no dirigidos. En ciertos casos descritos en este documento, un fragmento de una de las secuencias de miARN expuestas en la Tabla 9 puede usarse para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1. En otros ciertos casos descritos en este documento, un agente que bloquea la interacción entre una o más de las moléculas de miARN expuestas en la
- 15 Tabla 9 y su secuencia o secuencias diana de ARNm de PLK-1 pueden usarse para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1. Las moléculas de miARN o agentes de bloqueo de las mismas pueden comprender adicionalmente uno de los sistemas de vehículo descritos en este documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico) y encuentran utilidad en el tratamiento de cánceres tales como carcinoma hepatocelular.

20 También son adecuadas secuencias no modificadas o modificadas de pre-miARN correspondientes a cualquiera de las secuencias maduras de miARN enumeradas en la Tabla 9 para su uso como se describe en este documento, por ejemplo, para modular (por ejemplo, silenciar) la expresión de PLK-1. La molécula de pre-miARN puede comprender adicionalmente uno de los sistemas de vehículo descritos en este documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico) y encuentra utilidad en el tratamiento de cánceres tales como cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular).

25

Tabla 9. Secuencias de miARN que abordan la expresión de PLK-1 humana.

Nombre del miARN maduro	N° de acceso del miARN maduro	Secuencia del miARN maduro (5' → 3')	SEC ID N° del miARN maduro	N° de acceso del pre-miARN
hsa-miR-509-3-5p	MIMAT0004975	UACUGCAGACGUGGCAAUCAUG	317	MI0005717
mmu-miR-705	MIMAT0003495	GGUGGGAGGUGGGUGGGCA	318	MI0004689
hsa-miR-509-5p	MIMAT0004779	UACUG CAGACAG UGG CAAUCA	319	MI0003196
hsa-miR-505*	MIMAT0004776	GGGAGCCAGGAAGUAUUGAUGU	320	MI0003190
mmu-miR-762	MIMAT0003892	GGGGCUGGGGCCGGACAGAGC	321	MI0004215

Nombre del miARN maduro	Nº de acceso del miARN maduro	Secuencia del miARN maduro (5' → 3')	SEC ID Nº del miARN maduro	Nº de acceso del pre-miARN
hsa-miR-149*	MIMAT0004609	AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC	322	MI0000478
hsa-miR-183	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	323	MI0000273
hsa-miR-9*	MLMAT0000442	AUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGU	324	MI0000466
mmu-miR-673-3p	MIMAT0004824	UCCGGGGCUGAGUUCUGUGCACC	325	MI0004601
hsa-miR-630	MIMAT0003299	AGUAUUCUGUACCAGGGAAGGU	326	MI0003644
hsa-miR-491-3p	MIMAT0004765	CUUAUGCAAGAUUCCCUUCUAC	327	MI0003126
hsa-miR-559	MIMAT0003223	UAAAGUAAAUAGCACCACAAA	328	MI0003565
hsa-miR-593*	MIMAT0003261	AGGCACCAGCCAGGCAUUGCUCAGC	329	MI0003605
mmu-miR-327	MIMAT0004867	ACUUGAGGGGCAUGAGGAU	330	MI0005493
hsa-let-7f-2*	MIMAT0004487	CUAUACAGUCUACUGUCUUUCC	331	MI0000068
hsa-miR-100	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG	332	MI0000102
hsa-miR-767-3p	MIMAT0003883	UCUGCUCAUACCCCAUGGUUUUCU	333	MI0003763
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	CCUCCACACCCAAGGCUUGCA	334	MI0003205
hsa-miR-106b*	MIMAT0004672	CCGCACUGUGGGUACUUGCUGC	335	MI0000734
hsa-miR-568	MIMAT0003232	AUG UAUAAAUAGUAUACACAC	336	MI0003574
hsa-miR-652	MIMAT0003322	AAUGGCGCCACUAGGGUUGUG	337	MI0003667
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	CUAUACGGCCUCCUAGCUUUCC	338	MI0000066
hsa-miR-340	MIMAT0004692	UUUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	339	MI0000802
hsa-miR-198	MIMAT0000228	GGUCCAGAGG GGAGAUAGGUUC	340	MI0000240
hsa-miR-548b-5p	MIMAT0004798	AAAAGUAAUUGUGGUUUUGGCC	341	MI0003596
hsa-miR-452*	MIMAT0001636	CUCAUCUGCAAAGAAGUAAGUG	342	MI0001733
hsa-miR-148b*	MIMAT0004699	AAGUUCUGUUUAUACACUCAGGC	343	MI0000811
hsa-let-7g*	MIMAT0004584	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC	344	MI0000433
hsa-miR-488	MIMAT0004763	UUGAAAGGCUAUUUCUUGGUC	345	MI0003123
mmu-miR-693-5p	MIMAT0003472	CAGCCACAUCCGAAAGUUUUC	346	MI0004662
hsa-miR-136	MIMAT0000448	ACUCCAUUUGUUUUGAUGAUGGA	347	MI0000475
hsa-miR-744	MIMAT0004945	UGCGGGGCUAGGGCUAACAGCA	348	MI0005559
hsa-miR-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	349	MI0000813
hsa-miR-320	MIMAT0000510	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	350	MI0000542
hsa-miR-99a	MIMAT0000097	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG	351	MI0000101
hsa-miR-590-5p	MIMAT0003258	GAGCUUAUUCAUAAAAGUGCAG	352	MI0003602
hsa-miR-622	MIMAT0003291	ACAGUCUGCUGAGGUUGGAGC	353	MI0003636
hsa-miR-151-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUCACAGUCU AGU	354	MI0000809
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	355	MI0000458
hsa-miR-648	MIMAT0003318	AAGUGUGCAGGGCACUGGU	356	MI0003663
hsa-miR-643	MIMAT0003313	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	357	MI0003658
hsa-miR-19a*	MIMAT0004490	AGUUUUG CAUAGUUGCACUACA	358	MI0000073
hsa-miR-516b	MIMAT0002859	AUCUGGAG GUAAGAAGCACUUU	359	MI0003172
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	AGGGCCCCCCCUCAAUCCUGU	360	MI0000747
hsa-miR-619	MBvIAT0003288	GACCUGGACAUGUUUGUGCCCAGU	361	MI0003633
mmu-miR-742	MIMAT0004237	GAAAGCCACCAUGCUGGGUAAA	362	MI0005206
hsa-miR-147b	MIMAT0004928	GUGUGCGGAAUUGCUUCUGCUA	363	MI0005544
mmu-miR-466h	MIMAT0004884	UGUGUGCAUUGGCUUGUGUGUA	364	MI0005511
mmu-miR-700	MIMAT0003490	CACGCGGGAACCGAGUCCACC	365	MI0004684
hsa-miR-941	MBvIAT0004984	CACCCGGCUGUGUGCACAUGUGC	366	MI0005763
hsa-miR-21	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	367	MI0000077
mmu-miR-666-5p	MIMAT0003737	AGCGGGCACAGCUGUGAGAGCC	368	MI0004553
hsa-miR-17*	MIMAT0000071	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	369	MI0000071
hsa-miR-188-3p	MIMAT0004613	CUCCCAUAGCAGGGUUUGCA	370	MI0000484
hsa-miR-520d-5p	MIMAT0002855	CUACAAAGGGAAGCCCUUUC	371	MI0003164
hsa-miR-19 ^a	MIMAT0000073	UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA	372	MI0000073
hsa-miR-153	MIMAT0000439	UUGCAU AGUCACAAAAGUGAUC	373	MI0000463
hsa-miR-554	MIMAT0003217	GCUAGUCCUGACUCAGCCAGU	374	MI0003559
hsa-miR-610	MIMAT0003278	UGAGCUAAAUGUGUGCUGGGA	375	MI0003623
hsa-miR-454	MIMAT0003885	UAGUGCAAUAUUGCUUAUAGGGU	376	MI0003820
hsa-miR-10b*	MIMAT0004556	ACAGAUUCGAUUCUAGGGGAU	377	MI0000267
hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	UGGUGGGCCGCAGAACAUUGUC	378	MI0003676

Nombre del miARN maduro	Nº de acceso del miARN maduro	Secuencia del miARN maduro (5' → 3')	SEC ID Nº del miARN maduro	Nº de acceso del pre-miARN
mmu-miR-466f-5p	MIMAT0004881	UACGUGUGUGUGCAUGUGCAUG	379	MI0005507
hsa-miR-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	380	MI0000286
hsa-miR-603	MIMAT0003271	CACACACUGCAAUUACUUUUGC	381	MI0003616
hsa-miR-216b	MIMAT0004959	AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA	382	MI0005569
mmu-miR-704	MIMAT0003494	AGACAUGUGCUCUGCUCCUAG	383	MI0004688
hsa-miR-331-5p	MIMAT0004700	CUAGGUAUGGUCCCAGGGAUCC	384	MI0000812
mmu-miR-434-3p	MIMAT0001422	UWGAACCAUCACUCGACUCCU	385	MI0001526
hsa-miR-589	MIMAT0004799	UGAGAACCACGUCUGCUCUGAG	386	MI0003599
hsa-miR-548b-3p	MIMAT0003254	CAAGAACCUCAGUUGCUUUUGU	387	MI0003596
hsa-miR-10a*	MIMAT0004555	CAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA	388	MI0000266
hsa-miR-604	MIMAT0003272	AGGCGCGGAAUUCAGGAC	389	MI0003617
hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	390	MI0002469
mmu-miR-883b-3p	MIMAT0004851	UAACUGCAACAUCUCUCAGUUAU	391	MI0005477
hsa-miR-329	MIMAT0001629	AACACACCGGUUAACCUCUUU	392	MI0001725
hsa-miR-585	MIMAT0003250	UGGGCGUAUCUGUAUGCUA	393	MI0003592
hsa-miR-551b	MDAAT0003233	GCGACCCAUACUUGGUUUCAG	394	MI0003575
hsa-miR-886-3p	MIMAT0004906	CGCGGGUGCUUACUGACCCUU	395	MI0005527
mmu-miR-714	MIMAT0003505	CGACGAGGGCGGUGCGGUCGC	396	MI0004699
mmu-miR-293	MIMAT0000371	AGUGCCGCGAGGUUUGUAGUGU	397	MI0000391
hsa-miR-95	MIMAT0000094	UUCAACGG GUUUUUUAGAGCA	398	MI0000097
hsa-miR-99b	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	399	MI0000746

Los Nº de acceso para las secuencias de miARN maduro y pre-miARN corresponden con las entradas que pueden encontrarse en la miRBase Sequence Database del Sanger Institute. La miRBase Sequence Database es una base de datos de búsqueda de secuencias de miARN publicadas y comentarios.

Experimento 19. ARNip modificados adicionales para PLK-1 son no inmunoestimuladores e inhiben el crecimiento de células cancerosas.

- 5 Se formularon moléculas de ARNip para PLK-1 que contenían 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos en posiciones selectivas en las hebras con sentido y antisentido del ARNip como SNALP y se evaluaron para sus efectos inhibidores sobre el crecimiento celular *in vitro*. Las secuencias de hebra con sentido y antisentido del ARNip modificado para PLK-1 se muestran en la Tabla 10. Las moléculas modificadas bicatenarias ejemplares de ARNip para PLK-1 generadas a partir de las secuencias de la Tabla 10 se muestran en la Tabla 11.

10

Tabla 10. Secuencias de hebra con sentido y antisentido de ARNip modificado para PLK-1.

ARNip	Secuencia 5' → 3'	Hebra	SEC ID Nº
PLK1424-1	AGA <u>UCACCCUCCU</u> UAAAUUU	Con sentido	214
PLK1424-2	AGA <u>UCACCCUCCU</u> UAAAUUU	Con sentido	400
PLK1424-3	UAUUUAAGGAGGGUGA <u>UCUUU</u>	Antisentido	215
PLK1424-4	UAUUUAAGGAGGGUGA <u>UCUUC</u>	Antisentido	401
PLK1424-5	UAUUUAAGGAGGGUGA <u>UCUUC</u>	Antisentido	402
PLK1424-6	UAUUUAAGGAGGGUGA <u>UCUUC</u>	Antisentido	403
PLK1424-7	UAUUUAAGGAGGGUGA <u>UCUUU</u>	Antisentido	216
PLK1424-8	UAUUUAAGGAGGGUGA <u>UCUUU</u>	Antisentido	404
PLK773-1	AGACCUACCUC <u>CG</u> GAUCAAUU	Con sentido	220
PLK773-2	AGACCUACCUC <u>CG</u> GAUCAAGA	Con sentido	405
PLK773-3	UUGAUCCG <u>GAGGU</u> AGGUUUUU	Antisentido	223
PLK773-4	UUGAUCCG <u>GAGGU</u> AGGUUUUU	Antisentido	406
PLK773-5	UUGAUCCG <u>GAGGU</u> AGGUUUUU	Antisentido	407

Columna 1: El número después de "PLK" se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030.

Columna 2: Los 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos se indican en **negrita** y subrayados. El ARNip puede comprender alternativa o adicionalmente 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA).

Tabla 11. Moléculas de ARNip para PLK-1 que comprenden secuencias de hebra con sentido y antisentido.

ARNip	Secuencia de ARNip para PLK-1	% de modificación 2'OMe	% de modificación en región BC
PLK1424 1/3	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 214) 3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 215)	6/42 = 14,3%	6/38 = 15,8%
PLK1424 1/4	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 214) 3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 401)	6/42 = 14,3%	6/38 = 15,8%
PLK1424 1/5	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 214) 3'-C <u>U</u> UC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 402)	7/42 = 16,7%	6/38 = 15,8%
PLK1424 1/6	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 214) 3'-C <u>U</u> UC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 403)	8/42 = 19%	7/38 = 18,4%
PLK1424 1/7	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 214) 3'-UUUCUAGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 216)	7/42 = 16,7%	7/38 = 18,4%
PLK1424 1/8	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 214) 3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 404)	9/42 = 21,4%	9/38 = 23,7%
PLK1424 2/3	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 400) 3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 215)	7/42 = 16,7%	6/38 = 15,8%
PLK1424 2/4	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 400) 3'-CUUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 401)	7/42 = 16,7%	6/38 = 15,8%
PLK1424 2/5	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 400) 3'-C <u>U</u> UC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 402)	8/42 = 19%	6/38 = 15,8%
PLK1424 2/6	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 400) 3'-C <u>U</u> UC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 403)	9/42 = 21,4%	7/38 = 18,4%
PLK1424 2/7	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 400) 3'-UUUCUAGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 216)	8/42 = 19%	7/38 = 18,4%
PLK1424 2/8	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> AAAAU <u>A</u> UU-3' (SEC ID N° 400) 3'-UUUC <u>U</u> AGUGGGAG <u>G</u> AAUUUAU-5' (SEC ID N° 404)	10/42 = 23,8%	9/38 = 23,7%

Columna 1: El número después de "PLK" se refiere a la posición de nucleótido de la base 5' de la hebra con sentido respecto al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030.

Columna 2: Los 2'-O-metil (2'OMe) nucleótidos se indican en negrita y subrayados. El dúplex de ARNip puede comprender alternativa o adicionalmente 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F) nucleótidos, 2'-desoxi nucleótidos, 2'-O-(2-metoxietil) (MOE) nucleótidos, y/o nucleótidos de ácido nucleico cerrado (LNA).

Columna 3: Se proporcionan el número y porcentaje de 2'OMe-nucleótidos modificados en la molécula de ARNip.

Columna 4: Se proporcionan el número y porcentaje de nucleótidos modificados en la región bicatenaria (BC) de la molécula de ARNip.

Ensayos de viabilidad celular. Para ensayos de actividad de ARNip para PLK-1 *in vitro*, se cultivaron células HT29 en placas de 96 pocillos en presencia de ARNip para PLK-1 formulado en SNALP. Se realizó análisis de viabilidad celular a las 72 horas después de transfección con un intervalo de dosificaciones de SNALP para PLK-1. La Figura 40 muestra que diferentes patrones de modificación química en la secuencia de ARNip PLK1424 se toleraban bien y las moléculas modificadas de ARNip retenían potente actividad en la eliminación de células tumorales humanas.

Ensayos de estimulación inmune in vivo. Se realizaron estudios en animales para ensayar la actividad inmunoestimuladora de SNALP que contienen ARNip PLK1424 2'OMe-modificados. Se usaron ratones CD1 ICR hembra de 6 semanas de edad en este estudio. Se administró a los ratones ARNip formulados en SNALP resuspendidos en PBS mediante inyección intravenosa convencional en la vena lateral de la cola y después se sacrificaron 4 horas después de la administración de SNALP. La tolerabilidad del régimen de tratamiento se controló por el aspecto y comportamiento de los animales. Se recogió sangre por punción cardíaca y se procesó como plasma para el análisis de citoquinas de los niveles de proteínas IFN- α e IL-6 por ELISA. Se recogieron el hígado y el bazo de los mismos animales en RNALater (Sigma Co.) para el análisis de ARNm de IFIT1 por ensayo de ADNb (QG).

Artículos de ensayo

Grupo	Artículo de ensayo	ARNip	<i>n</i>	Lote	<i>Dosis de ARNip</i>	Día de trat.	Punto final	Datos y recogida de muestras
A	PBS	N/A	4		N/A			Pesos corporales en dosificación
B	1:57 PEG-cDMA (28 mM) pH cargado	PLK1424 1/3	4	390-062608-1	3 mg/kg	Día 0	4 h	Plasma terminal 4 h después de inyección
C		PLK1424 2/3	4	390-062608-2				
D		PLK1424 2/4	4	390-062608-3				
E		PLK1424 2/5	4	390-062608-4				
F		PLK1424 2/6	4	390-062608-5				Mitad del lóbulo lateral izquierdo del hígado en RNAlater y el bazo completo en RNAlater.
G		BimA mod 2/3	4	390-062608-7				
H		Vacío	4	390-062608-8				

La Figura 41 muestra que los ARNip PLK1424 modificados no inducían una respuesta de IFN- α que fuera mayor que los controles negativos "PBS" y "Vacío". Solamente el control positivo de ARNip BimA indujo proteína IFN- α en plasma por encima del nivel de detección (15,6 pg/ml). La Figura 42 muestra que no hubo inducción significativa de IFIT1 por encima de la de SNALP vacío con los ARNip PLK1424 1/3, PLK1424 2/3, PLK1424 2/4, y PLK1424 2/6. El análisis QG de IFIT1 fue más sensible que el ELISA de IFN- α para medir la inmunogenicidad porque resolvió la estimulación inmune de grado bajo.

Modelos de tumor subcutáneo. Se establecieron tumores Hep3B en ratones scid/beige por inyección subcutánea de células tumorales en el costado posterior izquierdo. Después se administraron las formulaciones SNALP ARNip PLK1424 por inyección intravenosa como una única dosis de 3 mg/kg. El grado de reducción del ARNm de PLK-1 se determinó en los tumores Hep3B aproximadamente 24 horas después de la administración de SNALP. La Figura 43 muestra que todos los ARNip PLK1424 ensayados produjeron un nivel equivalente de silenciamiento de ARNm de PLK-1 *in vivo*.

Ensayos de inducción de anticuerpo contra PEG-lípido *in vivo*. Se realizaron estudios en animales para ensayar la inducción de una respuesta de anticuerpos a los ARNip PLK1424 2'OMe-modificados que estaban encapsulados en una formulación SNALP 1:57 que contenía el conjugado lipídico PEG-cDMA. Se usaron ratones CD1 ICR hembra de seis semanas de edad en este estudio. Se administró a los ratones ARNip formulado en SNALP resuspendido en PBS mediante inyección intravenosa convencional en la vena lateral de la cola en los días 0, 7, y 14. Los ratones después se sacrificaron en el día 21. La tolerabilidad del régimen de tratamiento se controló por el aspecto, comportamiento, y peso corporal de los animales. Se midieron anticuerpos IgG e IgM anti-PEG-lípido en plasma en los días 7, 14, y 21 por ELISA.

La SNALP que contenía ARNip PLK1424 1/3 era sustancialmente menos inmunogénica que la SNALP que contenía la correspondiente secuencia de ARNip PLK1424 no modificada. En particular, la SNALP PLK1424 1/3 tuvo un potencial significativamente inferior para generar una respuesta de anticuerpos IgG o IgM contra el conjugado PEG-lípido PEG-cDMA. Además, la SNALP que contenía ARNip PLK1424 2/3, PLK1424 2/4, o PLK1424 2/6 produjo casi ausencia de respuestas detectables de anticuerpo contra el PEG-lípido. De hecho, la SNALP PLK1424 2/6 tuvo coherentemente la respuesta de anticuerpo más baja a PEG-cDMA de todas las secuencias de ARNip para PLK-1 ensayadas. Por tanto, la presente descripción proporciona métodos para diseñar y optimizar secuencias de ARNip para PLK-1 para reducir sustancialmente o anular las propiedades inmunogénicas de secuencias no modificadas de ARNip.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula modificada de ARNip para silenciar la expresión quinasa 1 tipo polo (PLK-1), en la que la molécula modificada de ARNip comprende una hebra con sentido que consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 400, una hebra antisentido complementaria, y una región bicatenaria de al menos 15 nucleótidos de longitud, y en la que la hebra antisentido comprende uno o más nucleótidos modificados en la región bicatenaria seleccionados entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.
2. La molécula modificada de ARNip de la reivindicación 1, en la que:
 - (a) la molécula modificada de ARNip comprende un saliente 3' en una o ambas hebras de la molécula modificada de ARNip, opcionalmente en la que uno o más de los nucleótidos en el saliente 3' comprenden nucleótidos modificados; o
 - (b) menos del 30% de los nucleótidos en la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados; o
 - (c) la molécula modificada de ARNip es menos inmunoestimuladora que una secuencia correspondiente de ARNip no modificado.
3. La molécula modificada de ARNip de la reivindicación 1, en la que la hebra antisentido consiste en la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID N° 403.
4. La molécula modificada de ARNip de la reivindicación 1, en la que del 15% al 30% de los nucleótidos en el ARNip modificado comprende nucleótidos modificados.
5. La molécula modificada de ARNip de la reivindicación 1, en la que la molécula modificada de ARNip comprende una región bicatenaria de 19 nucleótidos de longitud.
6. La molécula modificada de ARNip de la reivindicación 1, en la que la hebra antisentido comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido de 2'OMe-uridina en la región bicatenaria.
7. Un sistema de vehículo que comprende un ARNip modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, opcionalmente en el que el sistema de vehículo se selecciona entre el grupo que consiste en una partícula de ácido nucleico-lípido, un liposoma, una micela, un virosoma, un complejo de ácido nucleico, y mezclas de los mismos, tal como en el que el sistema de vehículo es una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:
 - una molécula modificada de ARNip de una cualquiera de las reivindicación 1 a 6;
 - un lípido catiónico; y
 - un lípido no catiónico.
8. El sistema de vehículo de la reivindicación 7 que es una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico, en el que:
 - (a) el lípido catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilamino-propano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), diestearildimetilamonio (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxipropilamina (DODMA), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetil-amino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), [5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilamino-propano (DOcarbDAP), 2,3-dilinoileiloxi-N,N-dimetilpropilamina (DLinDAP), 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), 1,2-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLinCDAP), y una mezcla de los mismos; o
 - (b) el lípido no catiónico es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol, y una mezcla de los mismos; o
 - (c) dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende adicionalmente un conjugado polietilenglicol (PEG)-lípido, un conjugado poliamida (ATTA)-lípido, o una mezcla de los mismos, que es opcionalmente

- (i) un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un PEG-diacilglicerol, un PEG-dialquiloxypropilo, un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida, y una mezcla de los mismos, o
- (ii) un conjugado polietilenglicol (PEG)-dialquiloxypropilo (PEG-DAA), preferiblemente un conjugado PEG-dimiristiloxipropilo (PEG-DMA), o
- (iii) del 1% en mol al 15% en mol, preferiblemente del 4% en mol al 15% en mol, más preferiblemente del 4% en mol al 10% en mol, del lípido total presente en la partícula; o

(d) el lípido catiónico comprende del 50% en mol al 65% en mol del lípido total presente en la partícula; o

(e) el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en el que el fosfolípido comprende del 4% en mol al 10% en mol, preferiblemente del 5% en mol al 9% en mol, del lípido total presente en la partícula, y en el que el colesterol o derivado del mismo comprende del 30% en mol al 40% en mol, preferiblemente del 30% en mol al 35% en mol, del lípido total presente en la partícula; o

(f) el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo que comprende del 30% en mol al 45% en mol, preferiblemente del 35% en mol al 40% en mol, del lípido total presente en la partícula; o

(g) la molécula modificada de ARNip está completamente encapsulada en la partícula de ácido nucleico-lípido; o

(h) la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una proporción másica lípido:ARNip de 5 a 15; o

(i) la partícula de ácido nucleico-lípido tiene un diámetro medio de 50 nm a 150 nm.

9. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 8, en la que el fosfolípido de (e) es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diesteoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoilfosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), diesteoilfosfatidiletanolamina (DSPE), monometilfosfatidiletanolamina, dimetilfosfatidiletanolamina, dielaidoilfosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoilfosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), y una mezcla de los mismos.

10. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 8, en la que el derivado de colesterol de (e) o (f) es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en colestanol, colestano, colesteno, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, y colesteryl-4'-hidrobutil éter.

11. Una composición farmacéutica que comprende:

(i) una molécula modificada de ARNip de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6; o

(ii) una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico; y

(iii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Un método *in vitro* para introducir un ARNip que silencie la expresión de quinasa 1 tipo polo (PLK-1) en una célula, comprendiendo el método:

poner en contacto la célula con una molécula modificada de ARNip de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico.

13. Una molécula modificada de ARNip de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 que comprende dicho ARNip modificado, un lípido catiónico y un lípido no catiónico, para su uso en un método para el suministro *in vivo* de un ARNip que silencie la expresión de quinasa 1 tipo polo (PLK-1), comprendiendo dicho método administrar dicha molécula de ARNip o dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un sujeto mamífero *in vivo*.

14. La molécula modificada de ARNip o partícula de ácido nucleico-lípido para el uso de la reivindicación 13 en la que:

(a) la administración se selecciona entre el grupo que consiste en oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intra-articular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, e intradérmica; o

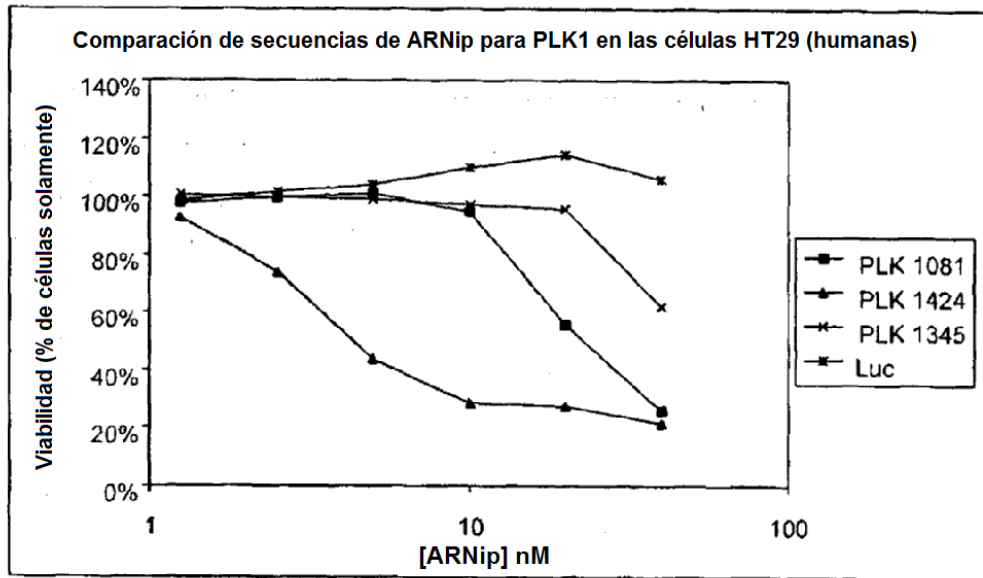
(b) dicho método es para tratar un cáncer en un sujeto mamífero que lo necesita, opcionalmente en el que el cáncer es cáncer de hígado, tal como carcinoma hepatocelular.

15. Un ARNip modificado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o un sistema de vehículo de acuerdo con la reivindicación 7, para su uso en un método *in vivo* para sensibilizar una célula cancerosa a los efectos de un fármaco quimioterapéutico, comprendiendo el método:

poner en contacto la célula cancerosa con dicha molécula de ARNip antes de administrar el fármaco quimioterapéutico; opcionalmente en el que:

- (a) la célula cancerosa está en un mamífero; o
- (b) el fármaco quimioterapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en paclitaxel, fluorouracilo (5-FU), irinotecano, sorafenib, y mezclas de los mismos.

A



B

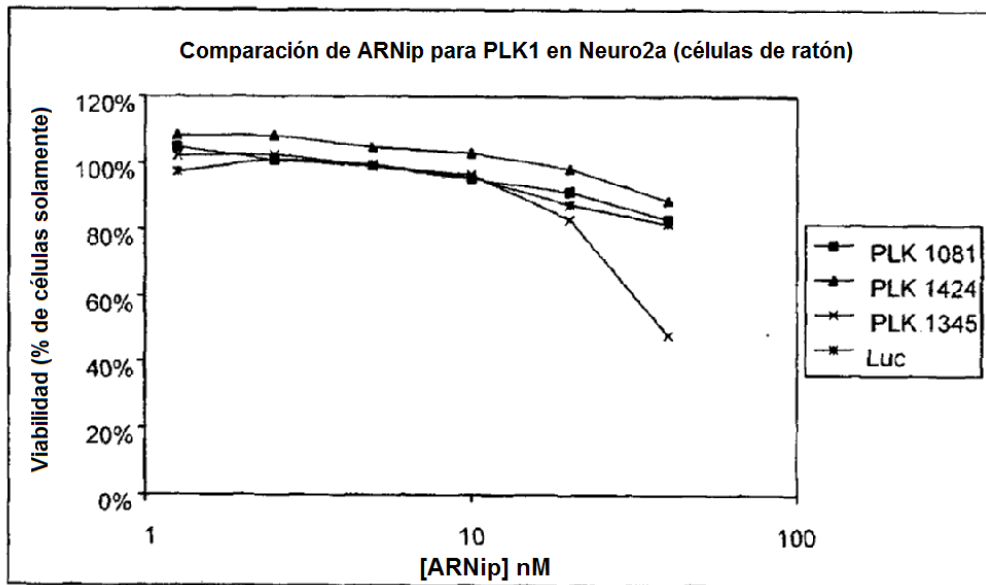
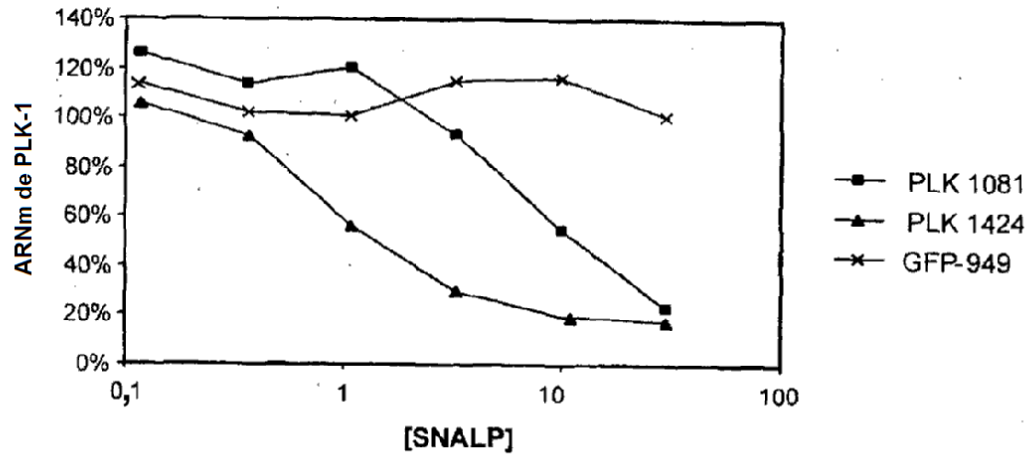


FIG. 1

A

Comparación de niveles de ARNm en células HT29 tratadas con ARNip para PLK-1



B

Comparación de viabilidad en células HT29 tratadas con ARNip para PLK-1

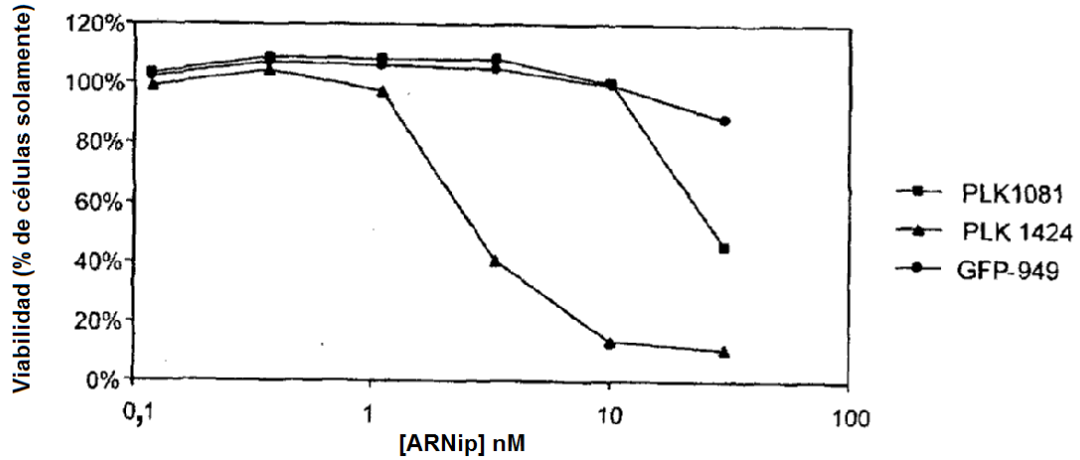
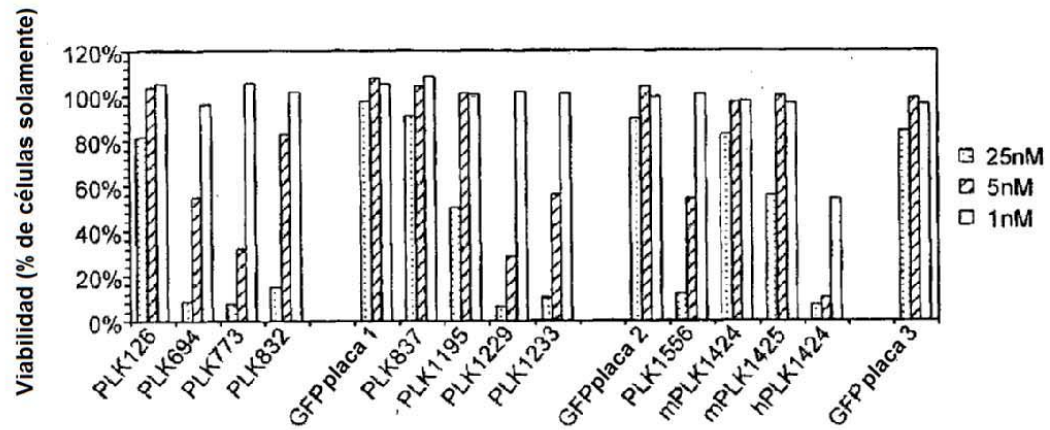


FIG. 2

A Selección de SNALP para PLK1 en células HT29 (humanas)



B Selección de SNALP para PLK1 en células Neuro2a (ratón)

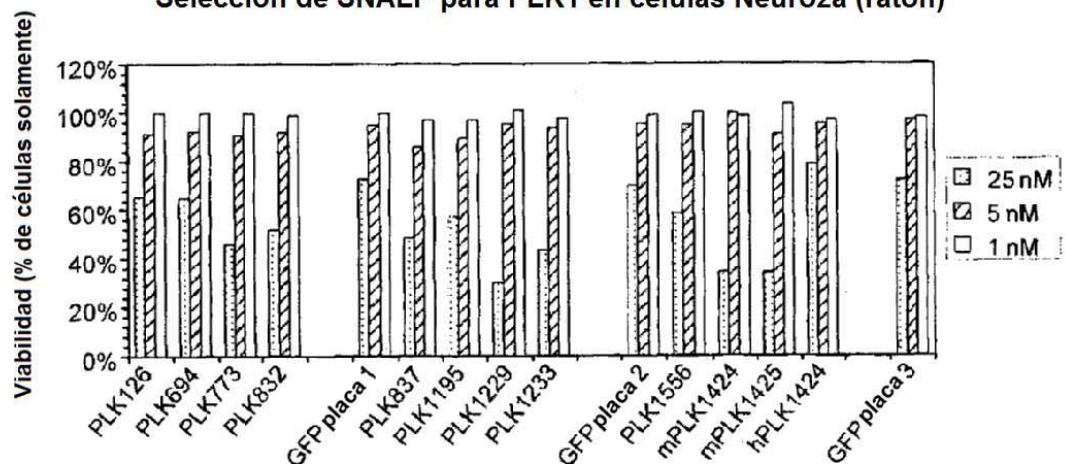


FIG. 3

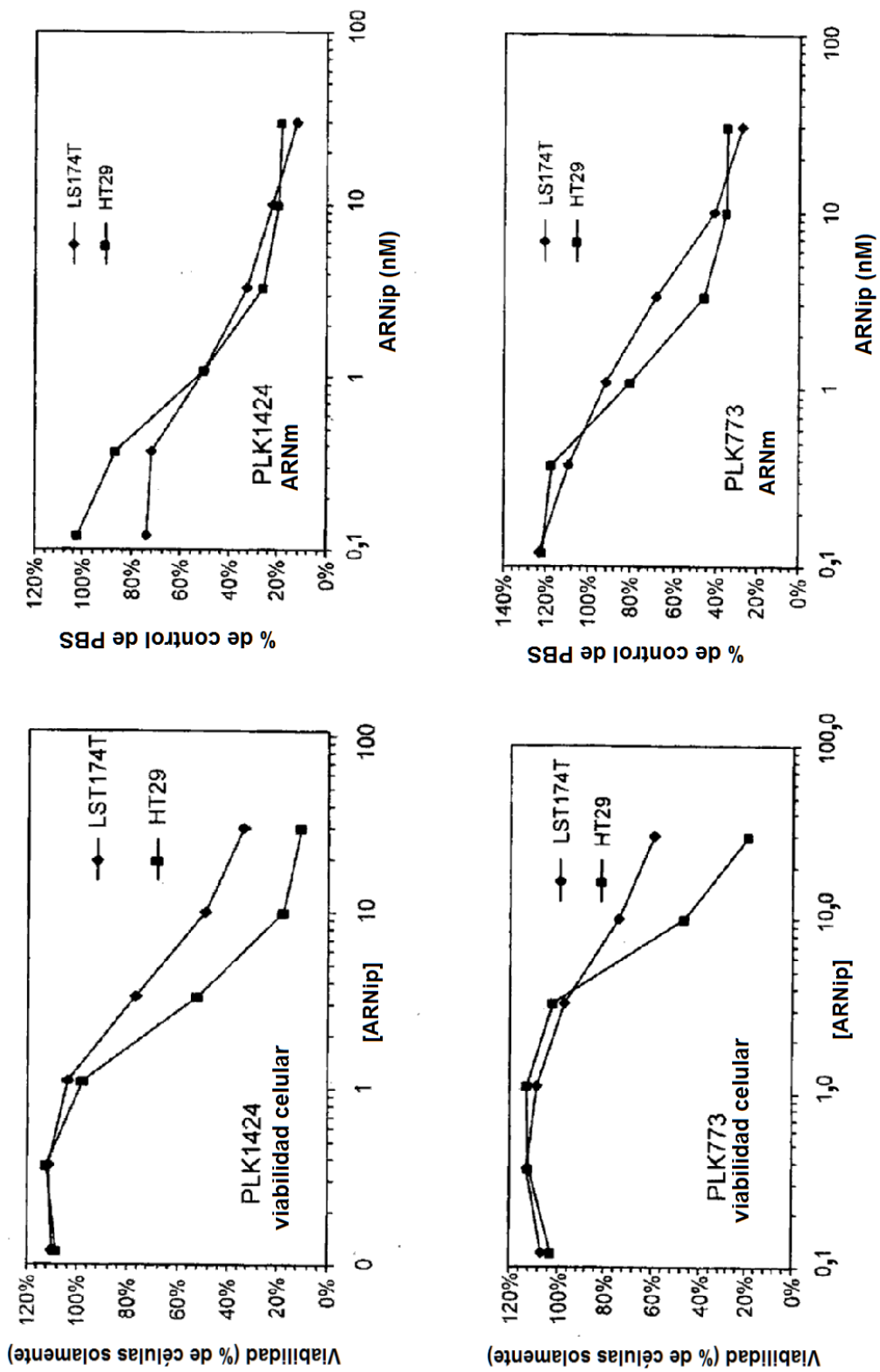
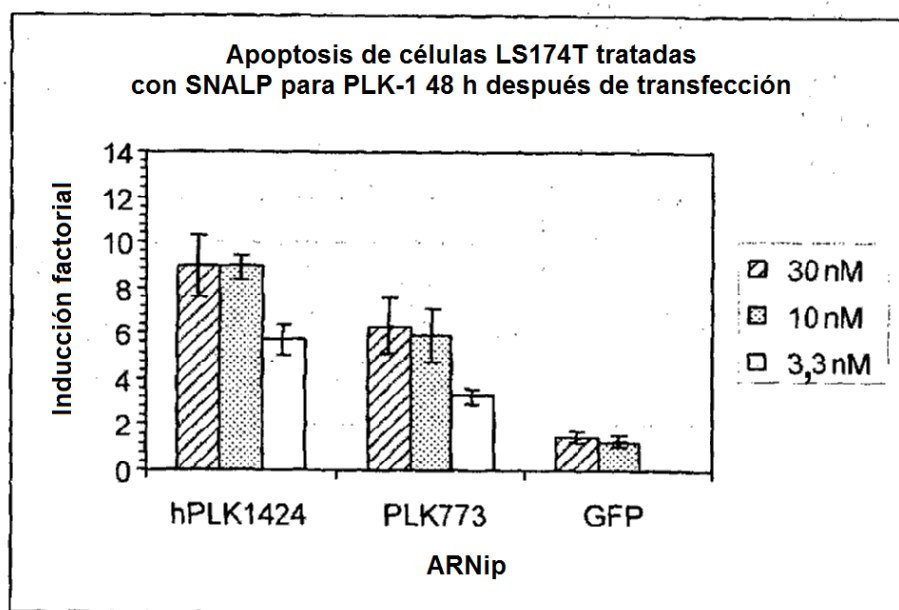


FIG. 4

**FIG. 5**

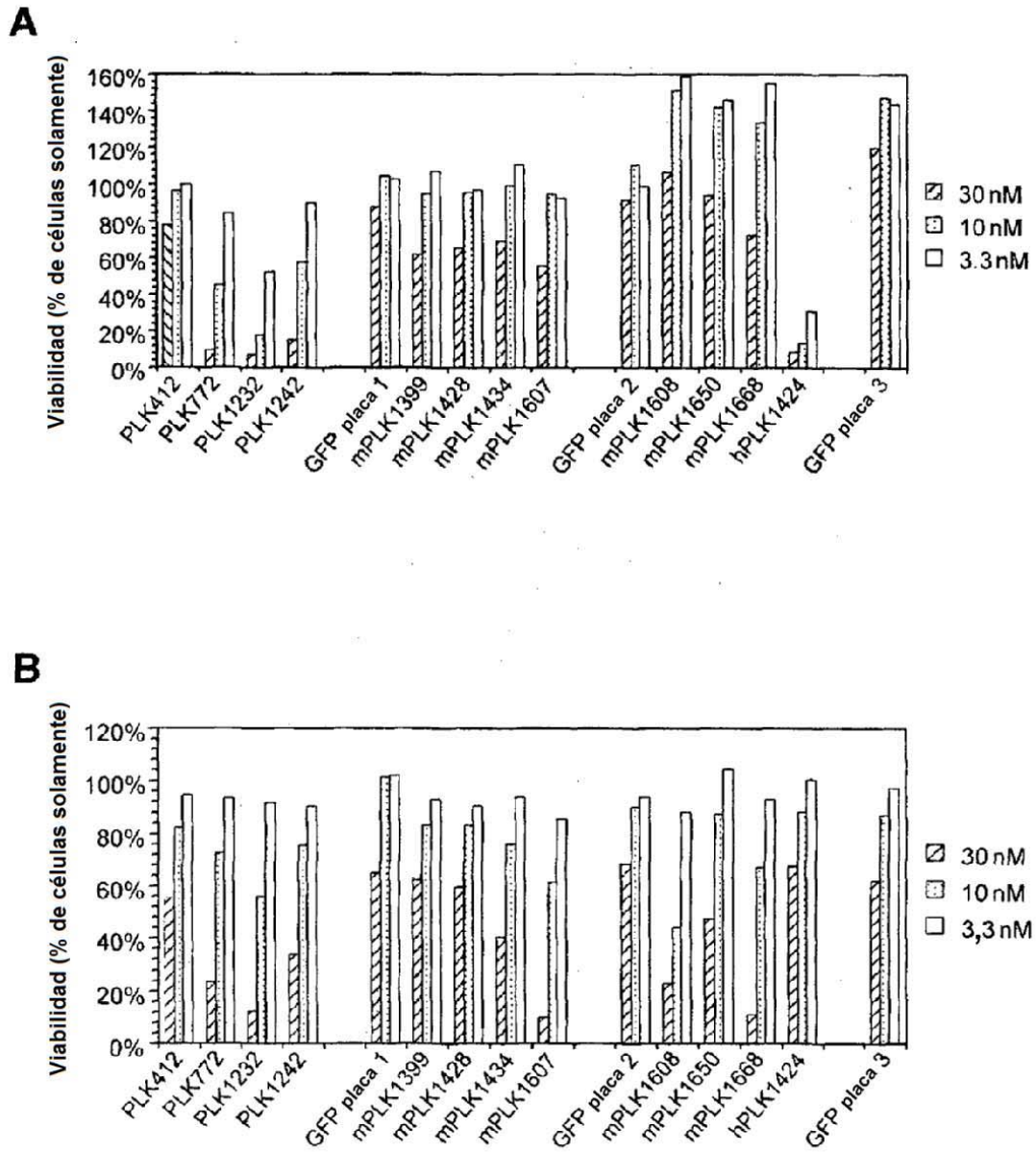


FIG. 6

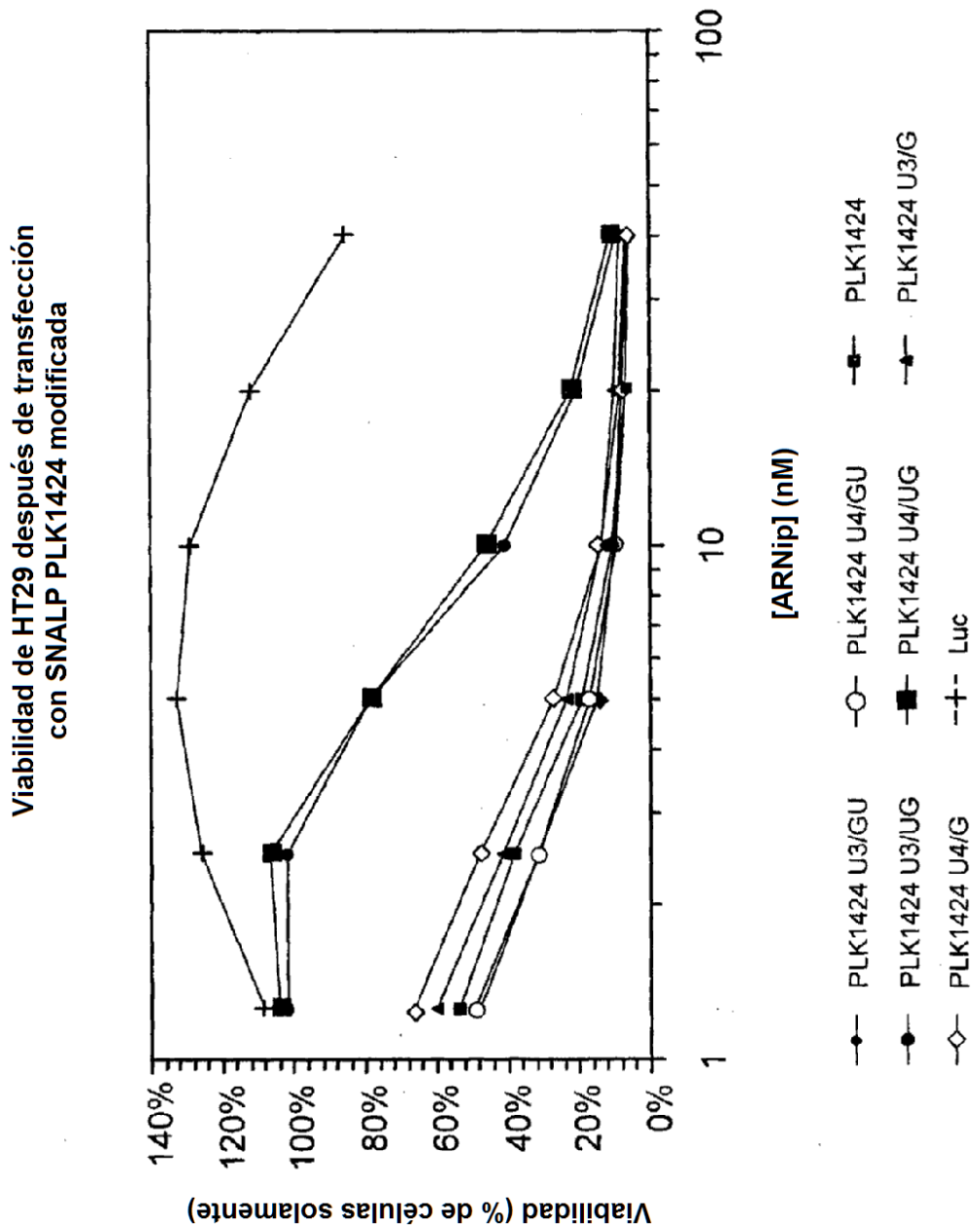


FIG. 7

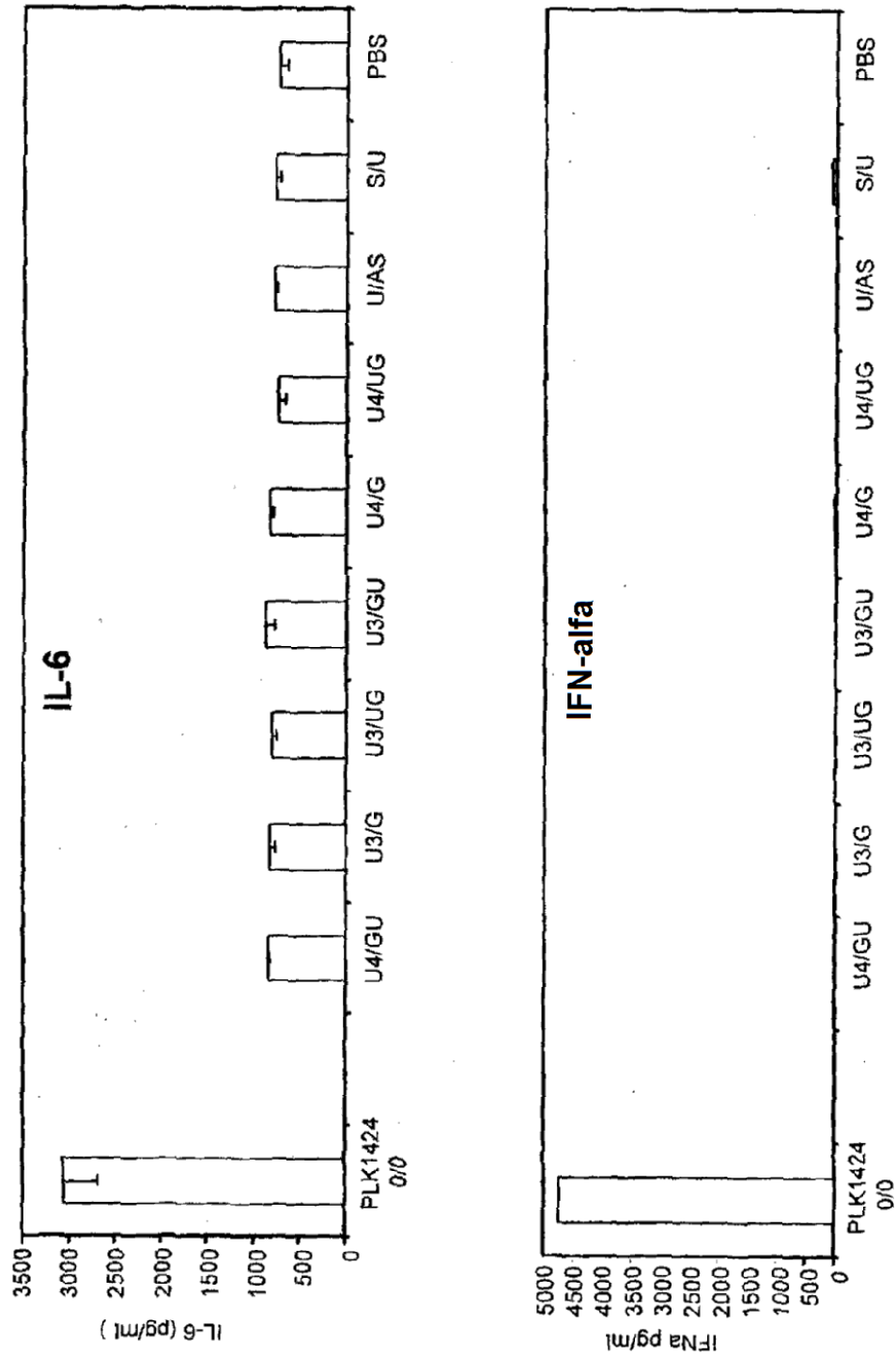


FIG. 8

Viabilidad de HT29 después de transfección
con SNALP PLK773 modificada

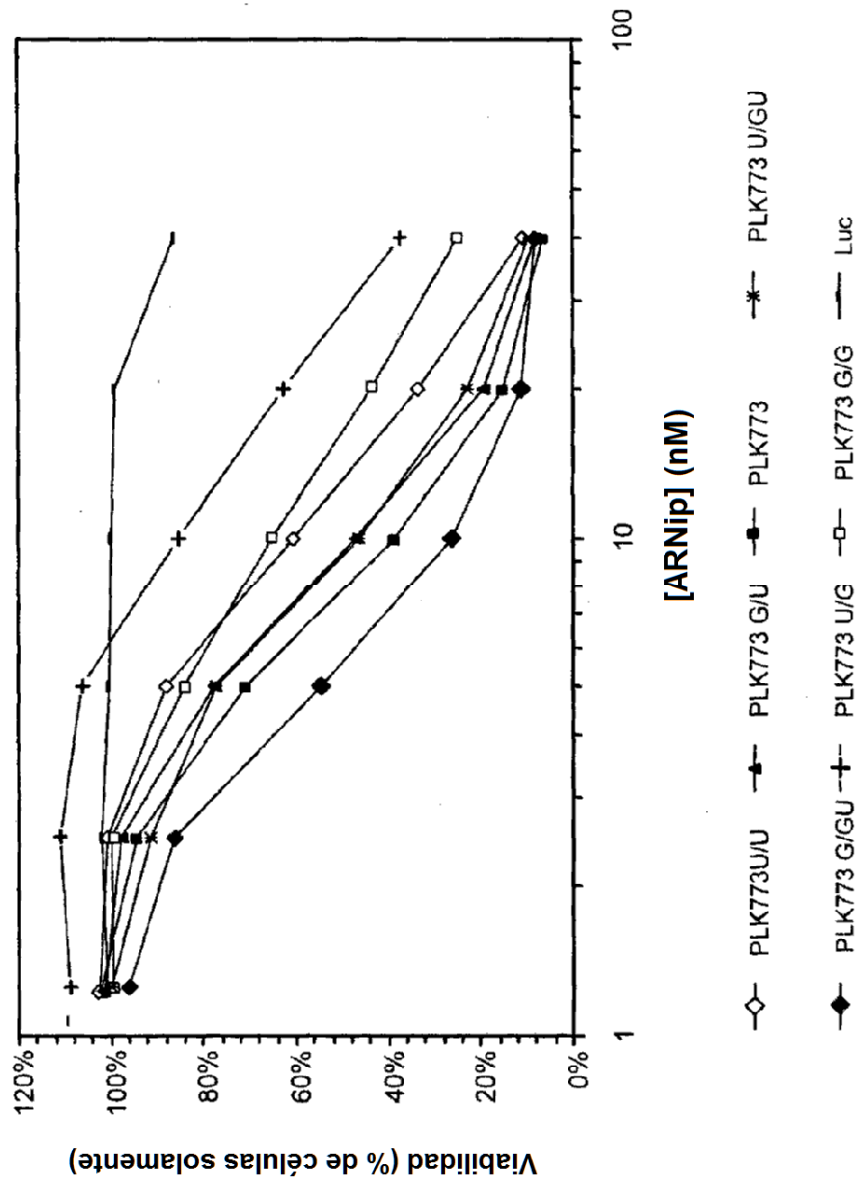


FIG. 9

Viabilidad celular en células HT29 tratadas con SNALP PLK1425

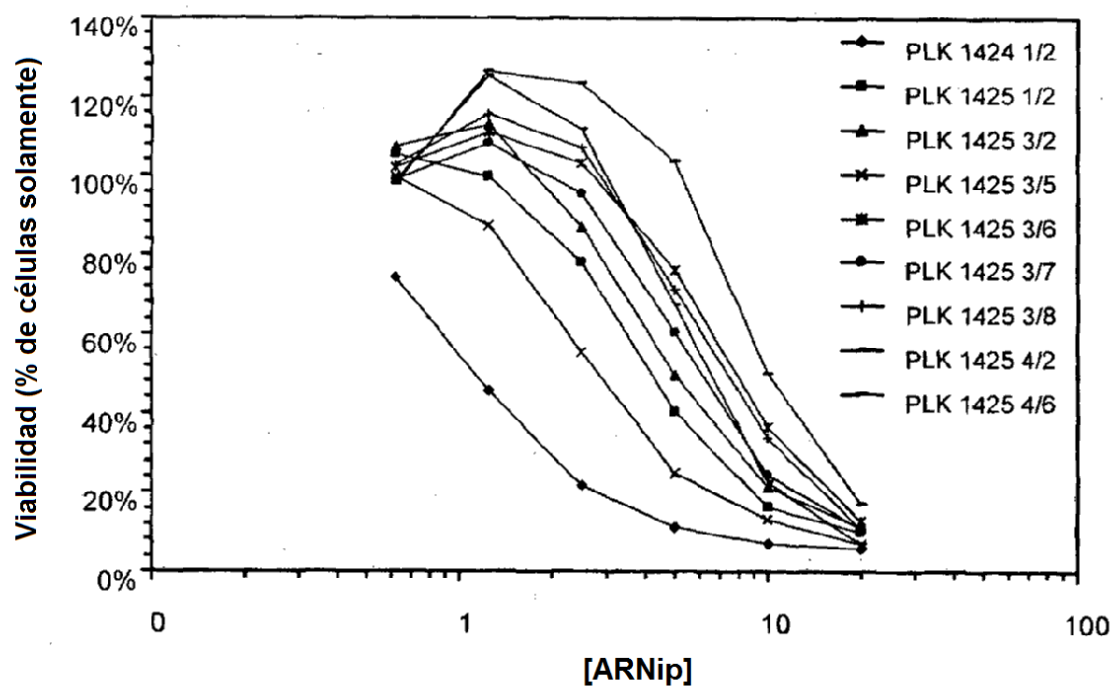
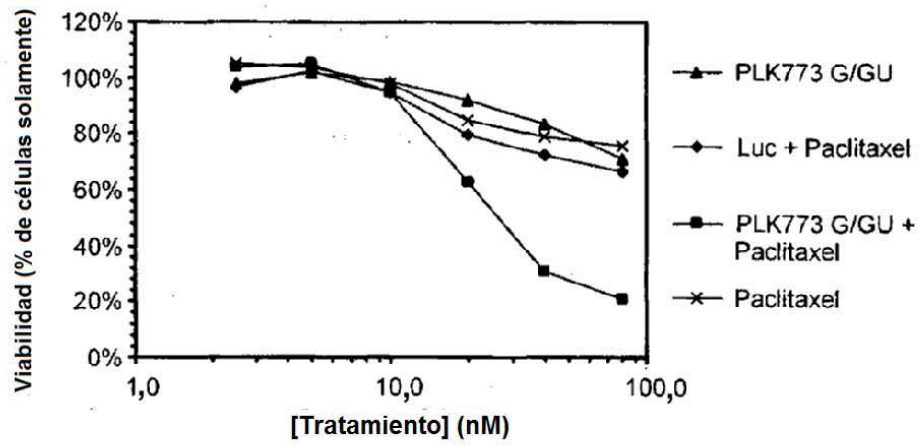


FIG. 10

Viabilidad de Neuro2a después de SNALP PLK773 y paclitaxel secuenciales



Viabilidad de HepG2 después de SNALP PLK1424 y paclitaxel secuenciales

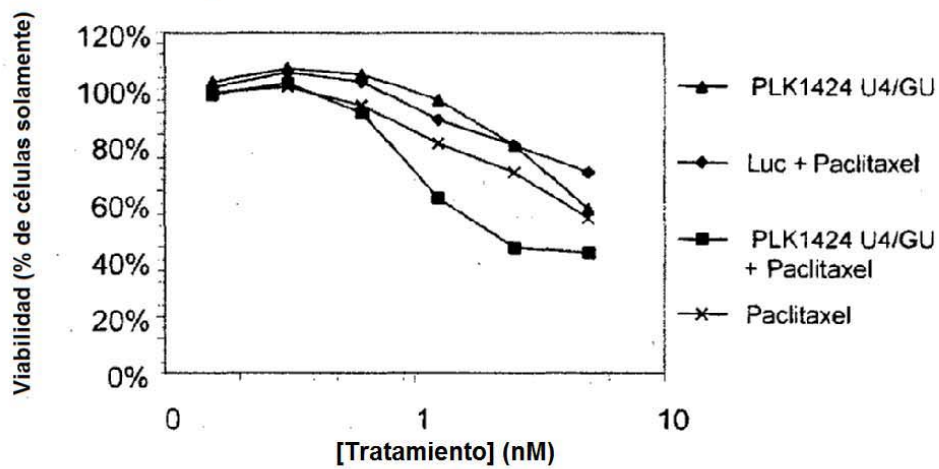


FIG. 11

Inducción de apoptosis por SNALP para PLK-1 en combinación
con Taxol en células Neuro2A

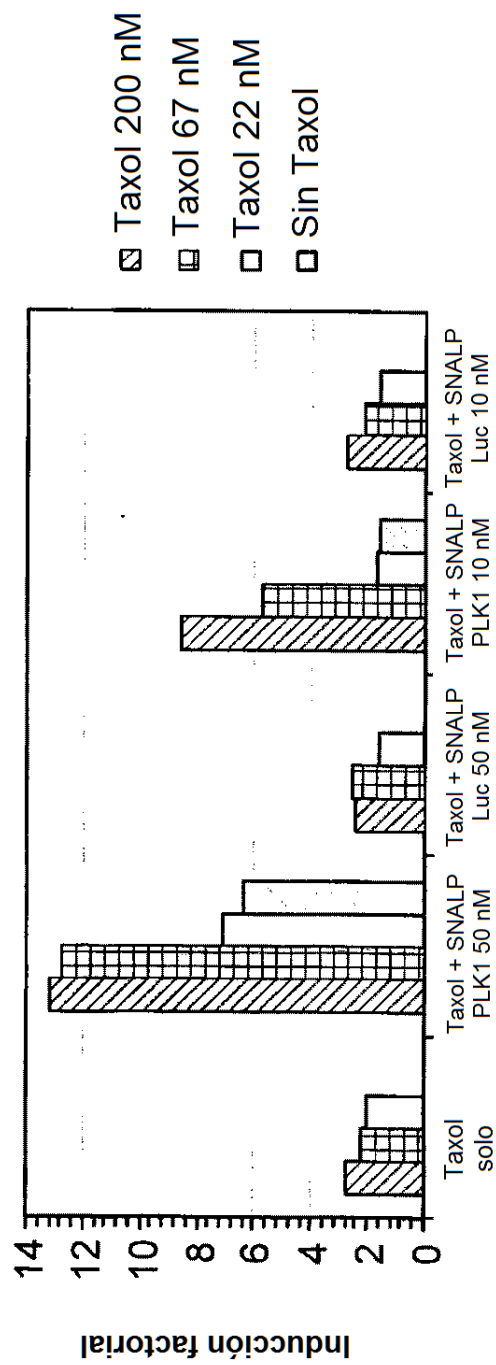


FIG. 12

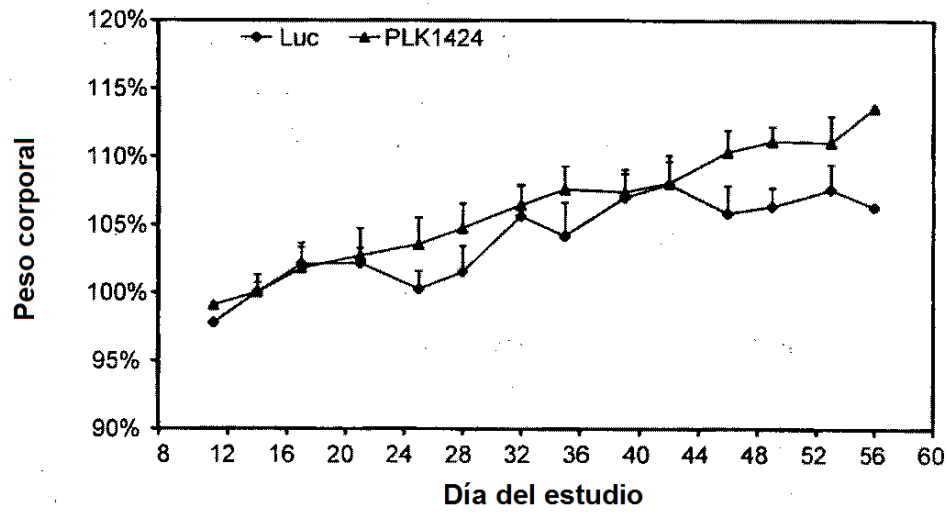
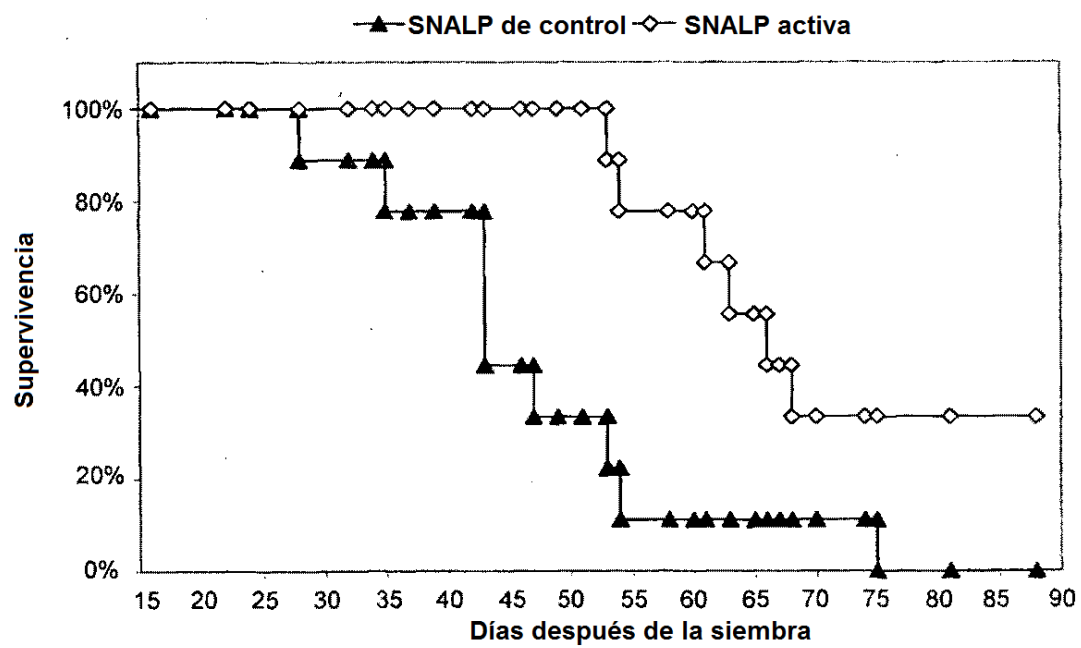


FIG. 13

**FIG. 14**

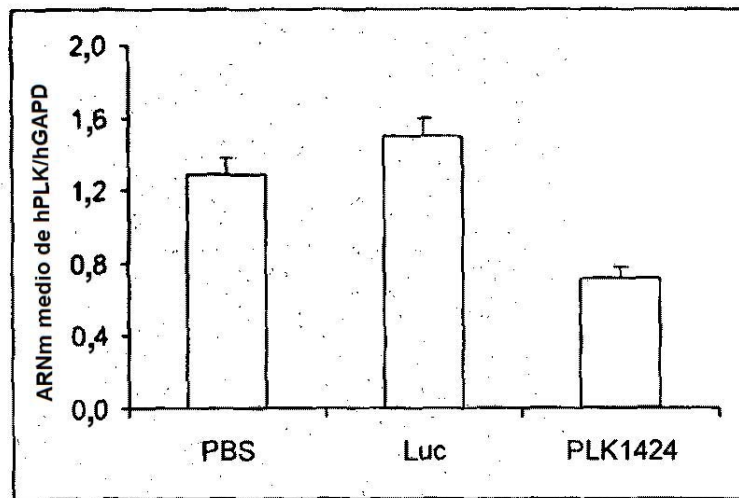


FIG. 15

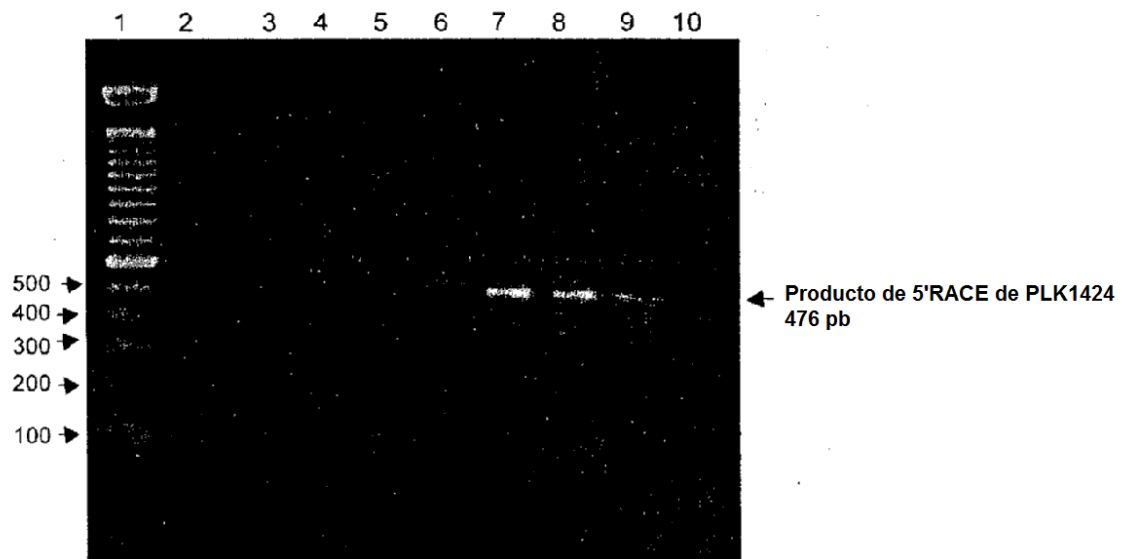


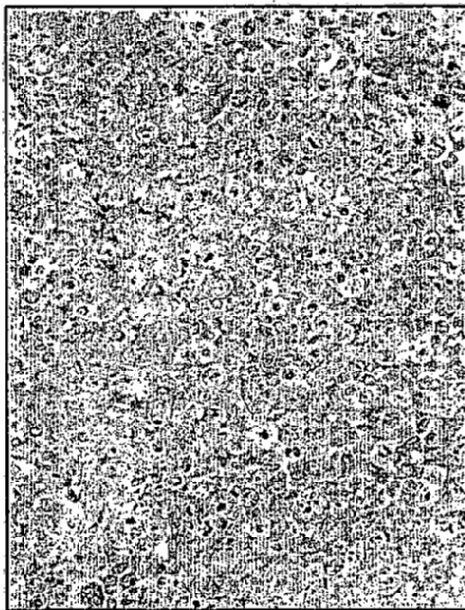
FIG. 16



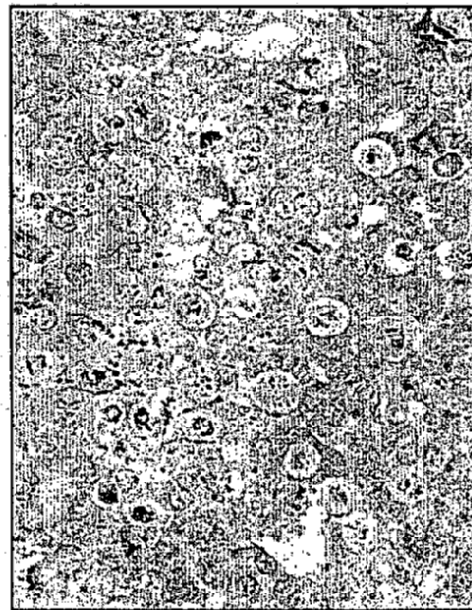
aum. 200x



aum. 400x



aum. 200x



aum. 400x

FIG. 17

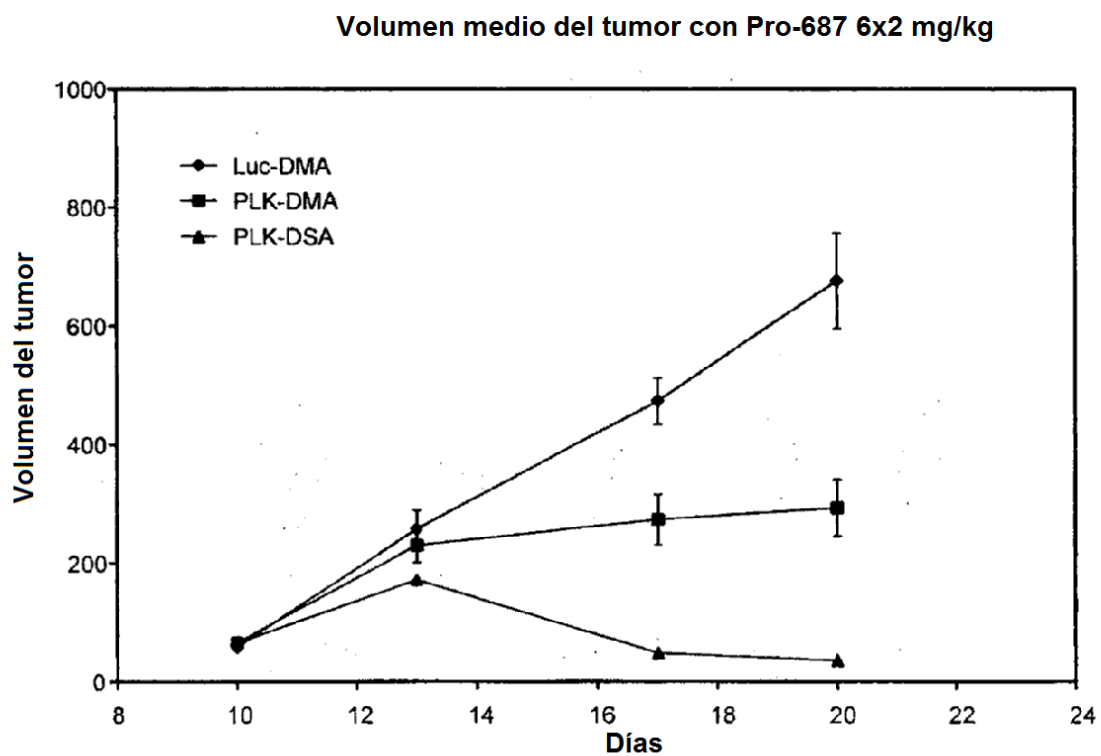
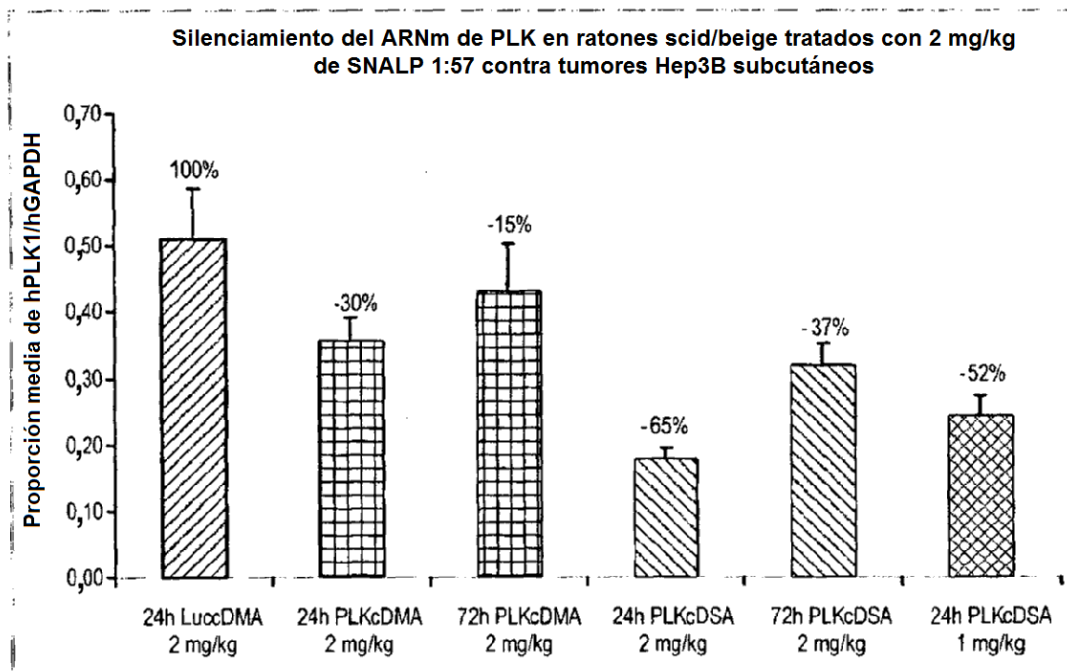


FIG. 18

**FIG. 19**

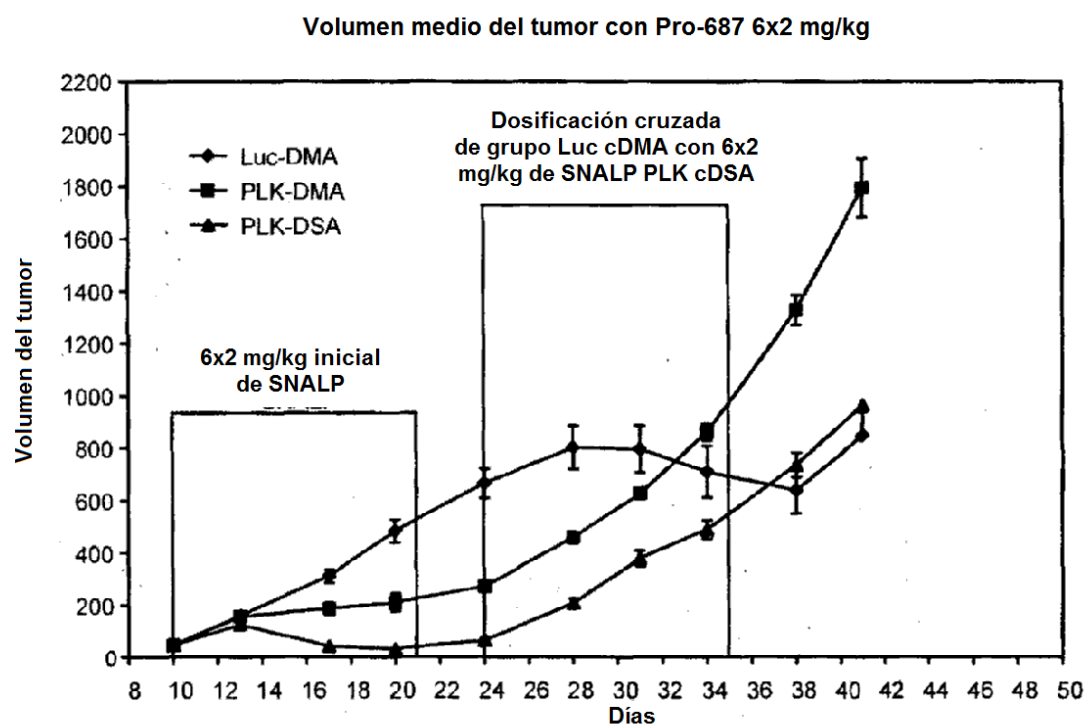
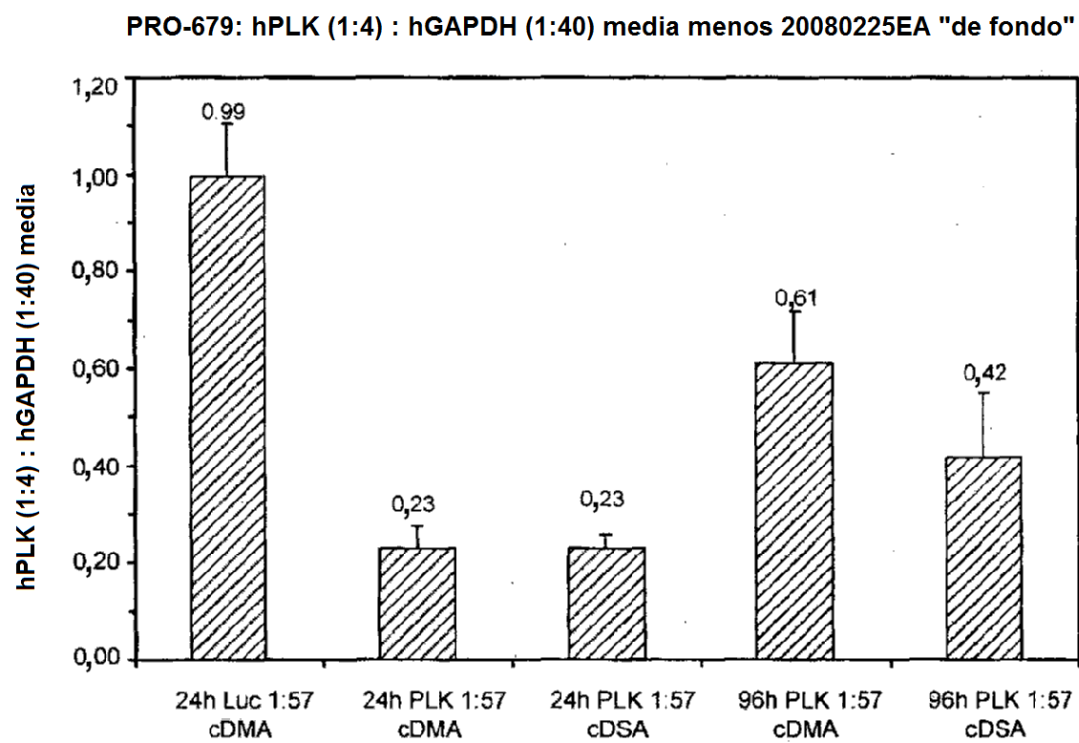
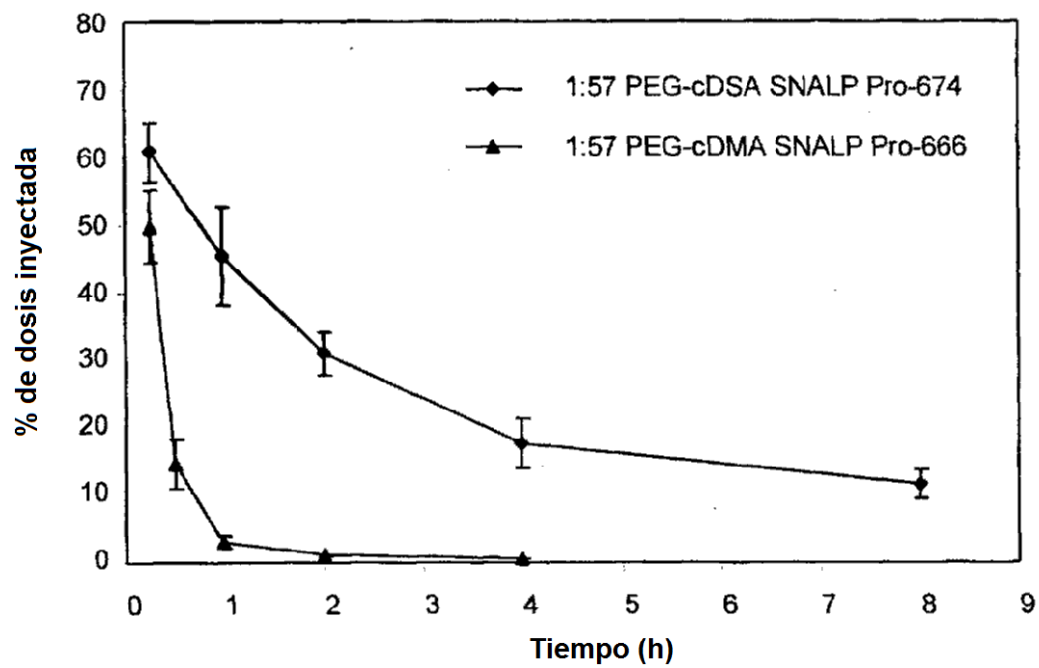


FIG. 20

**FIG. 21**

**FIG. 22**

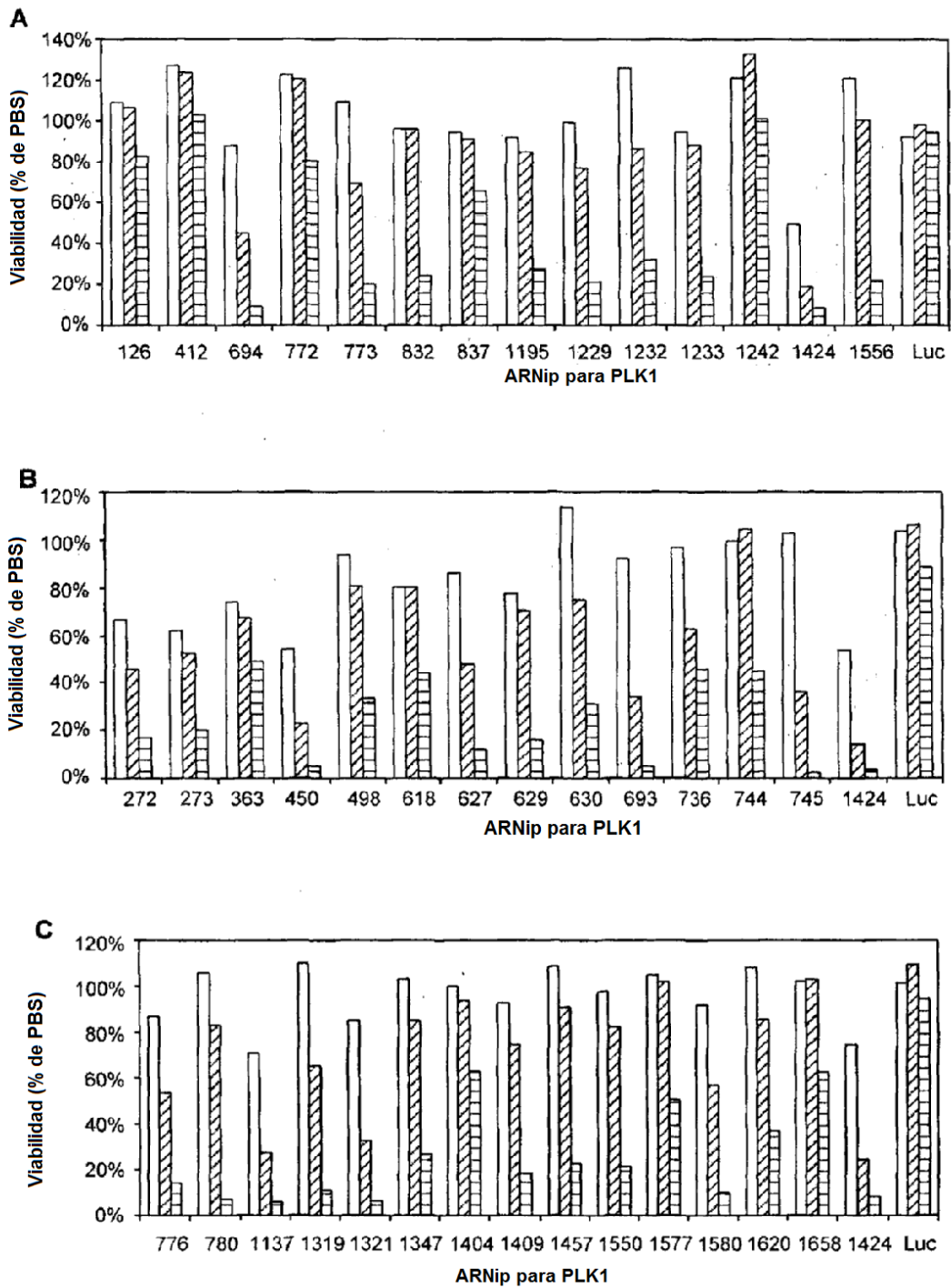


FIG. 23

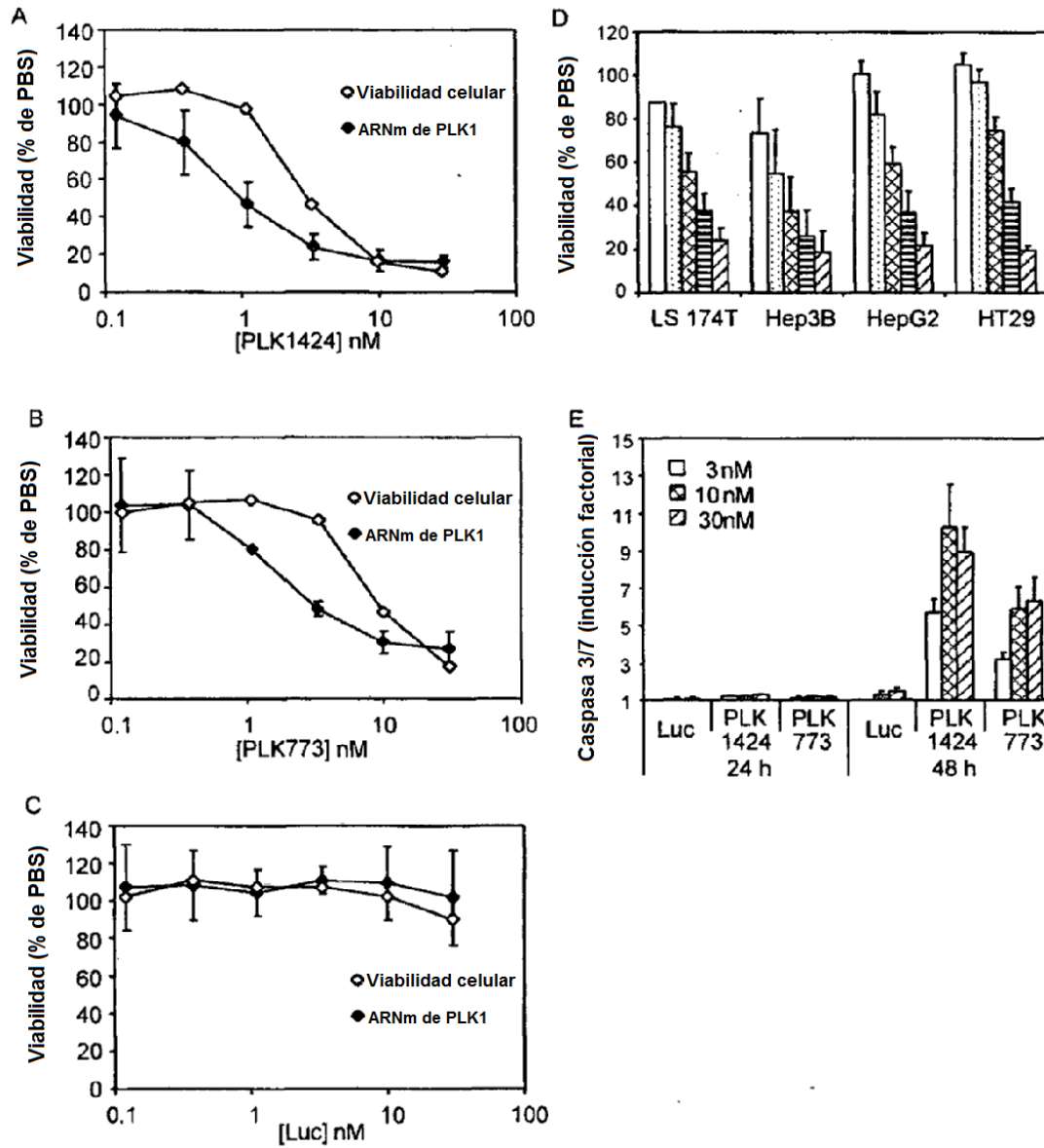


FIG. 24

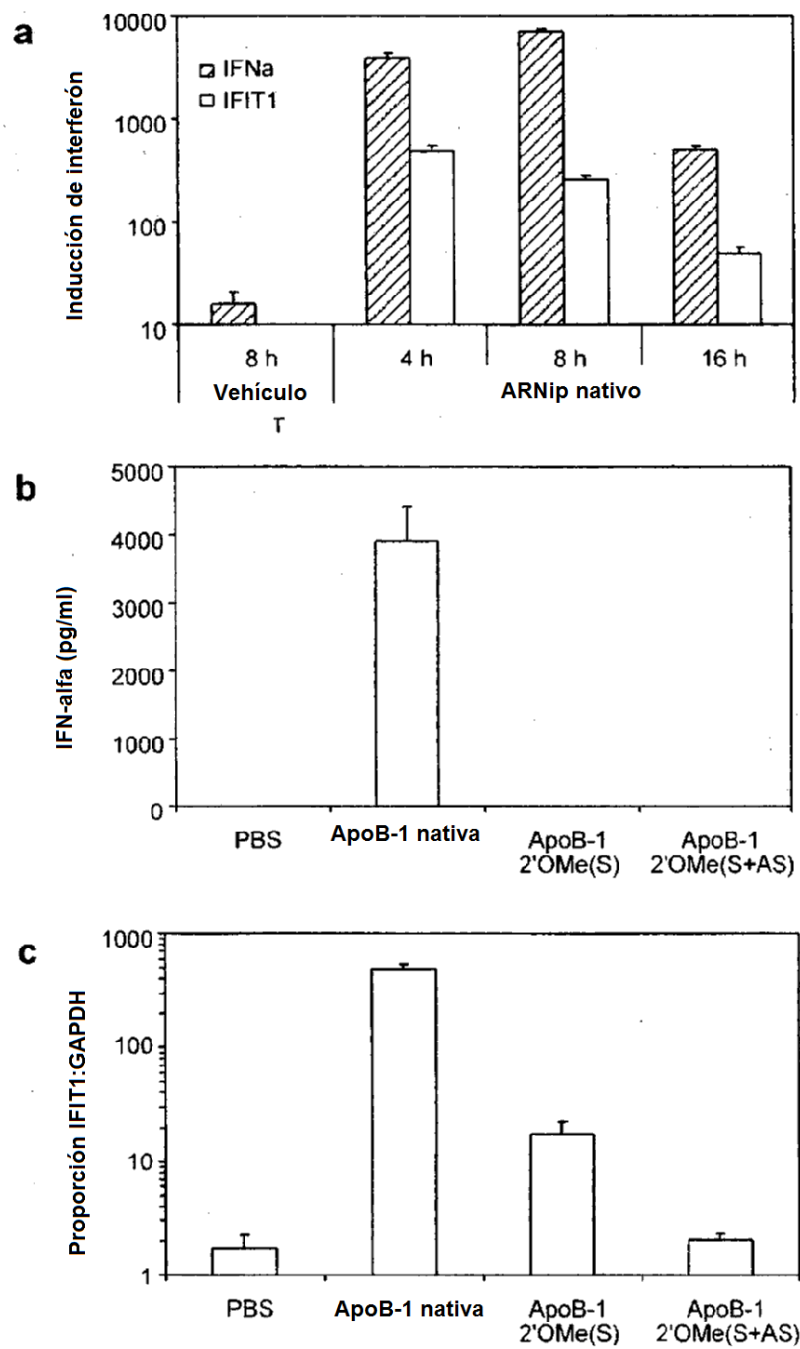


FIG. 25

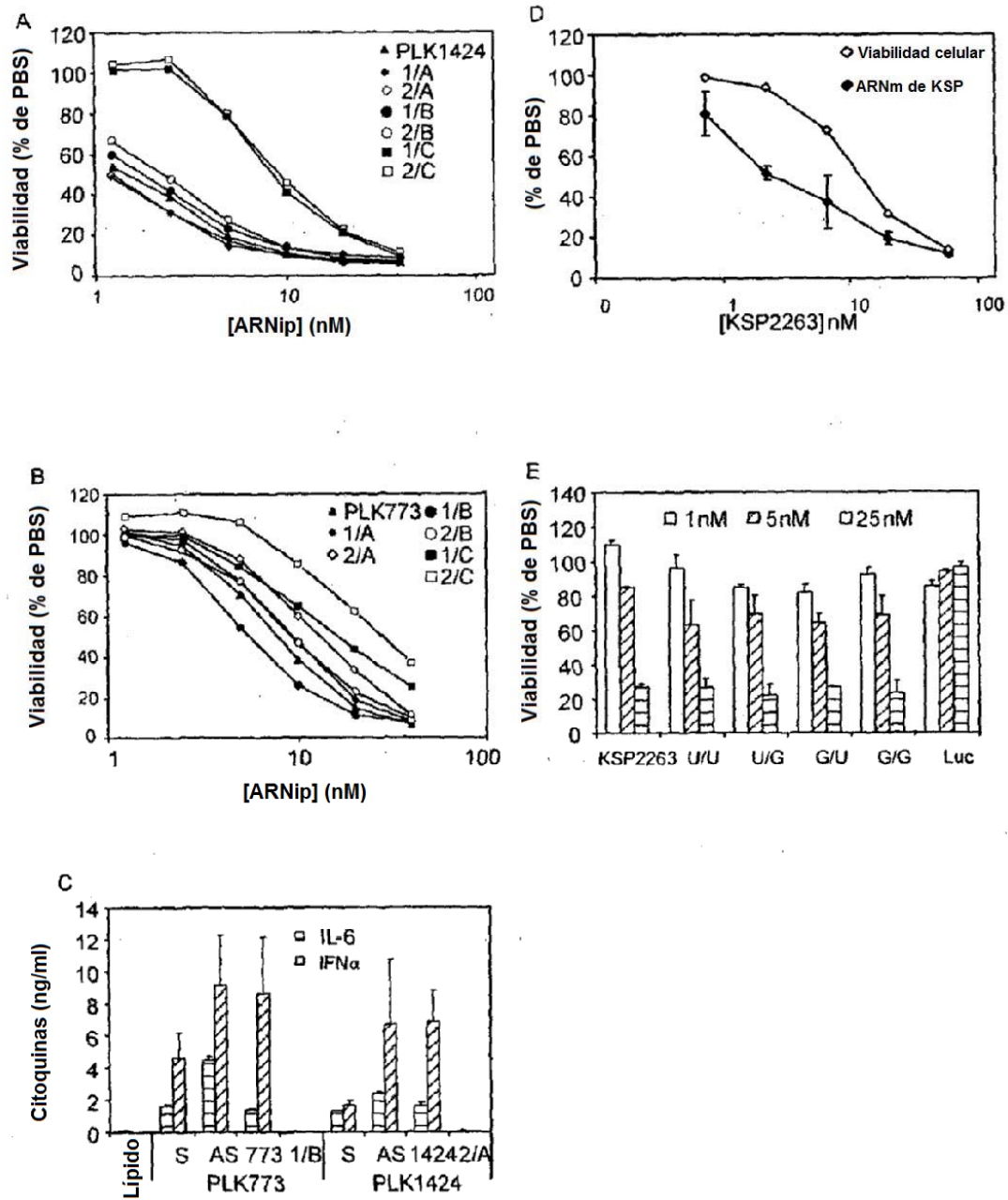


FIG. 26

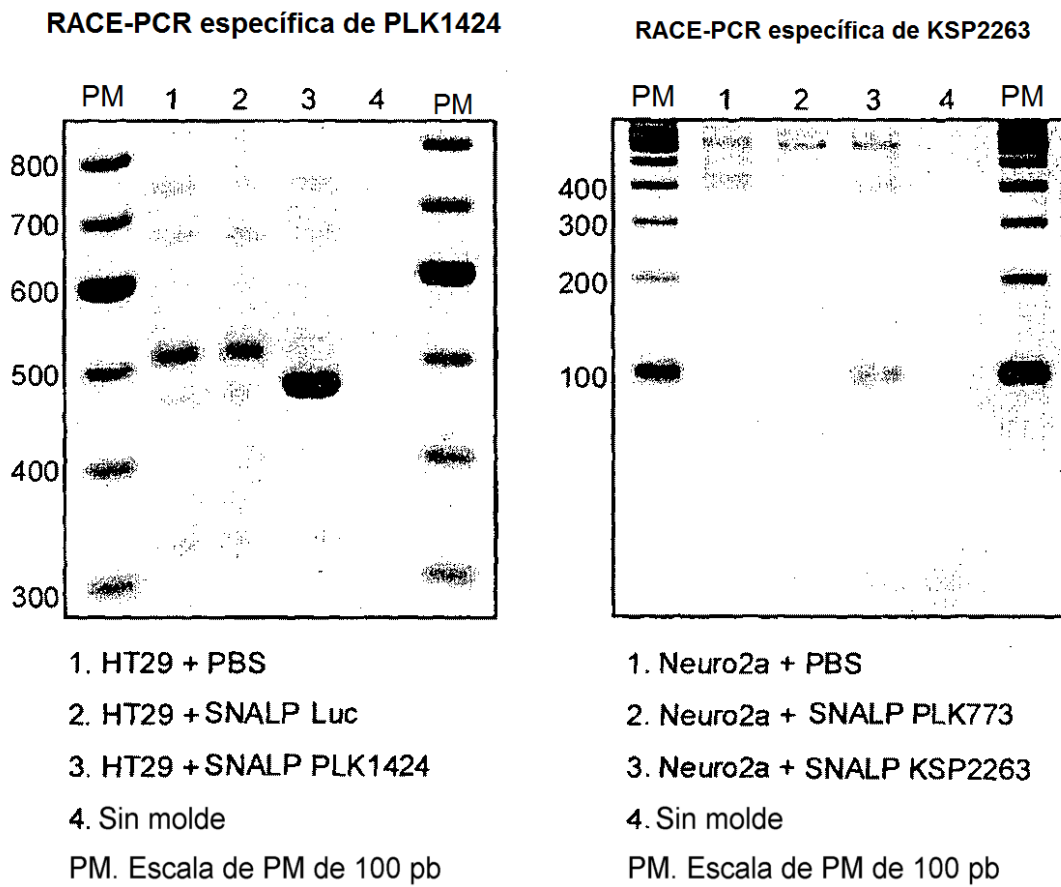


FIG. 27

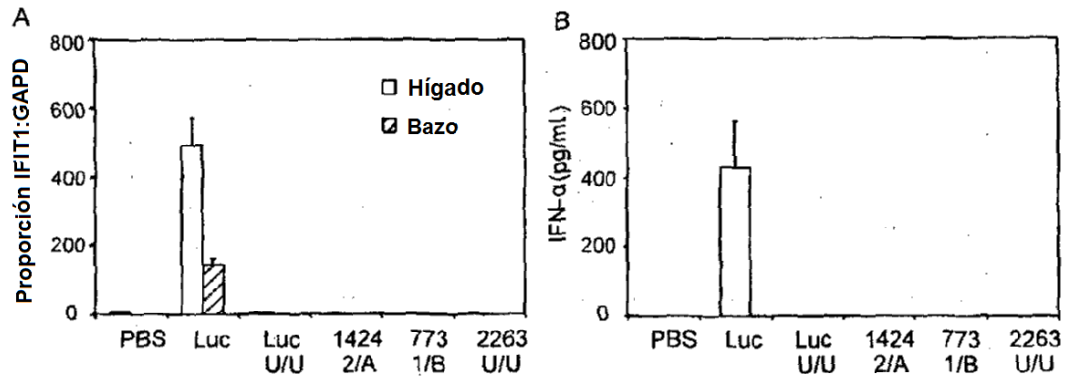


FIG. 28

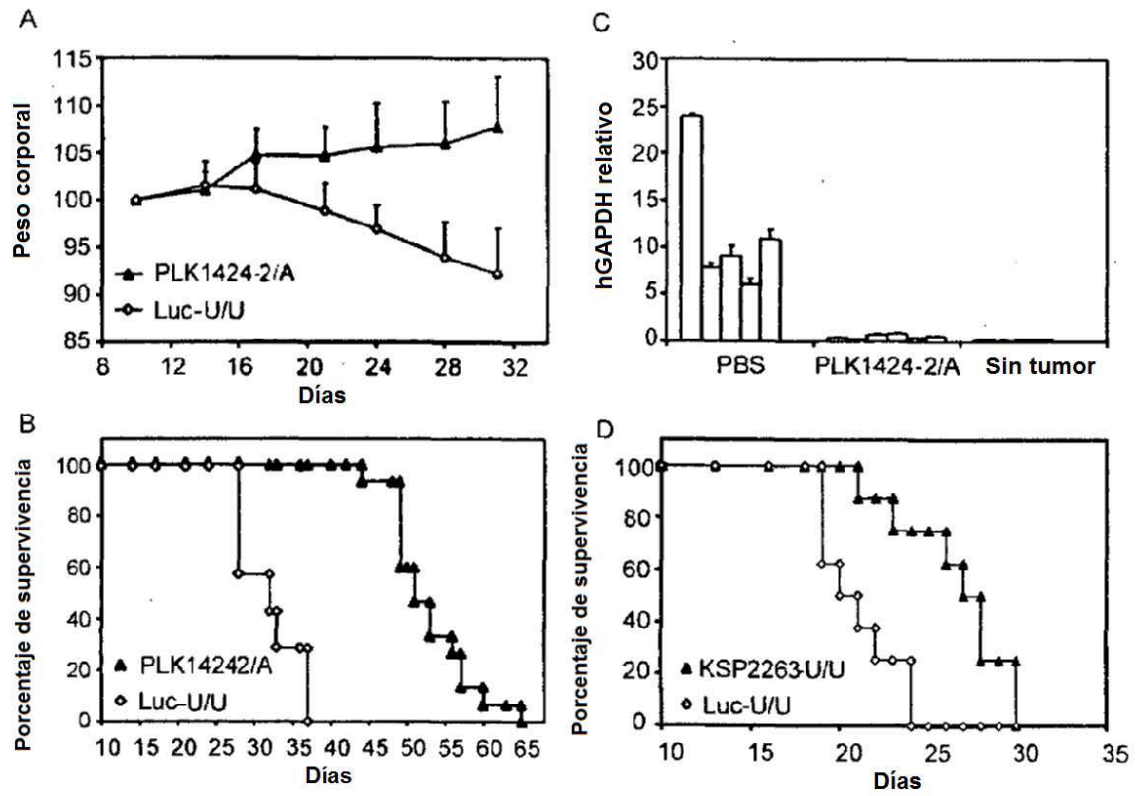
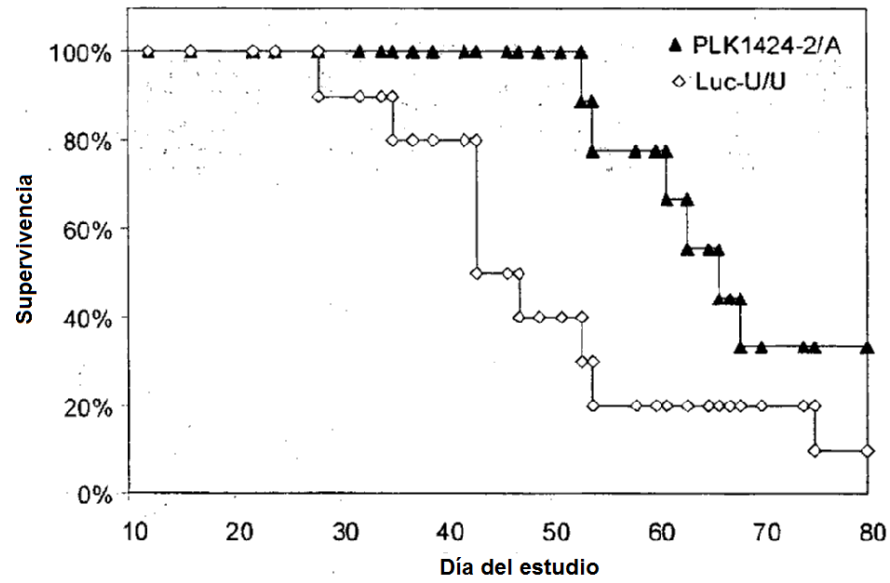


FIG. 29

A



B

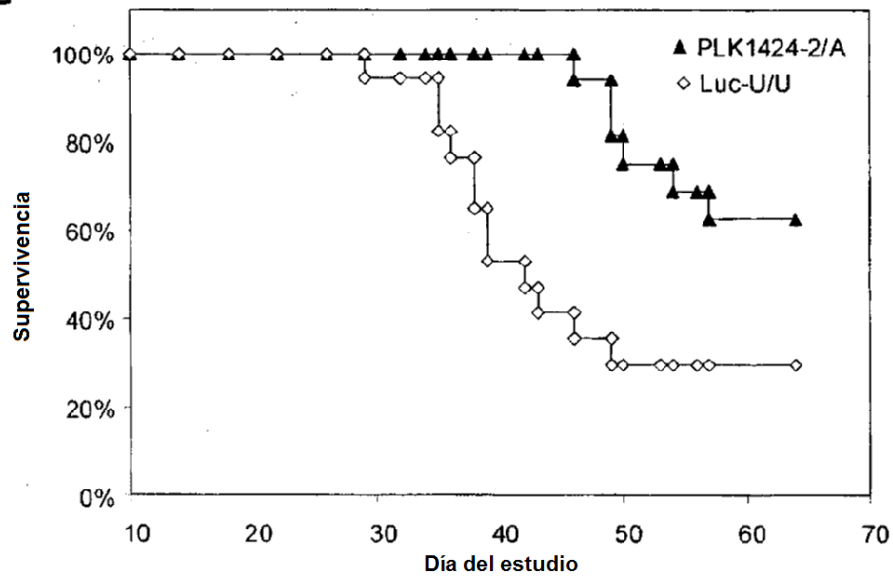


FIG. 30

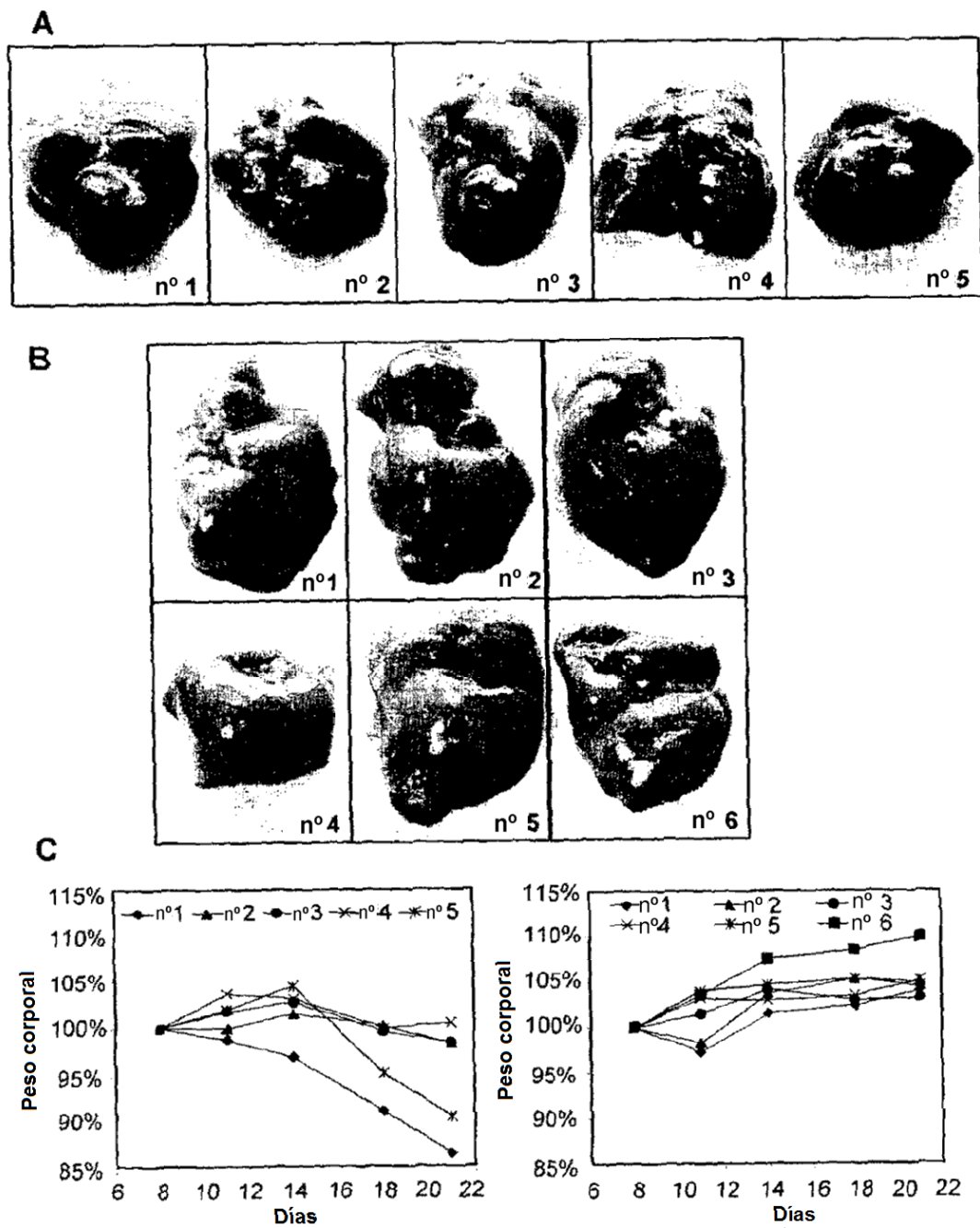


FIG. 31

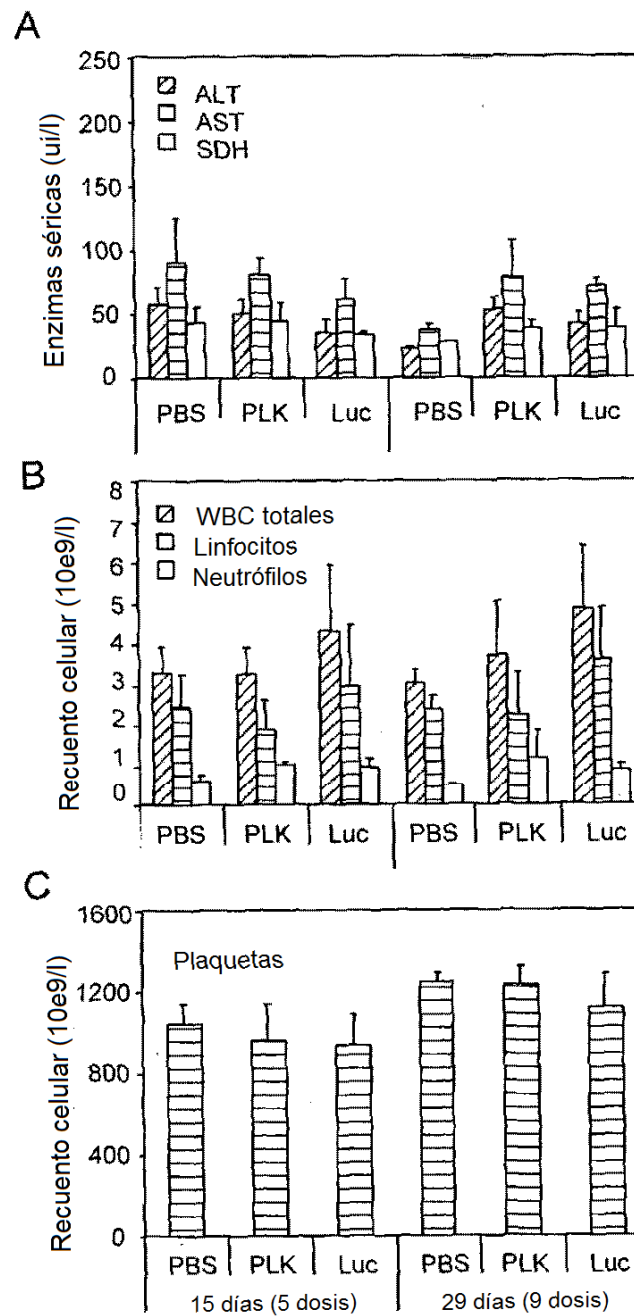


FIG. 32

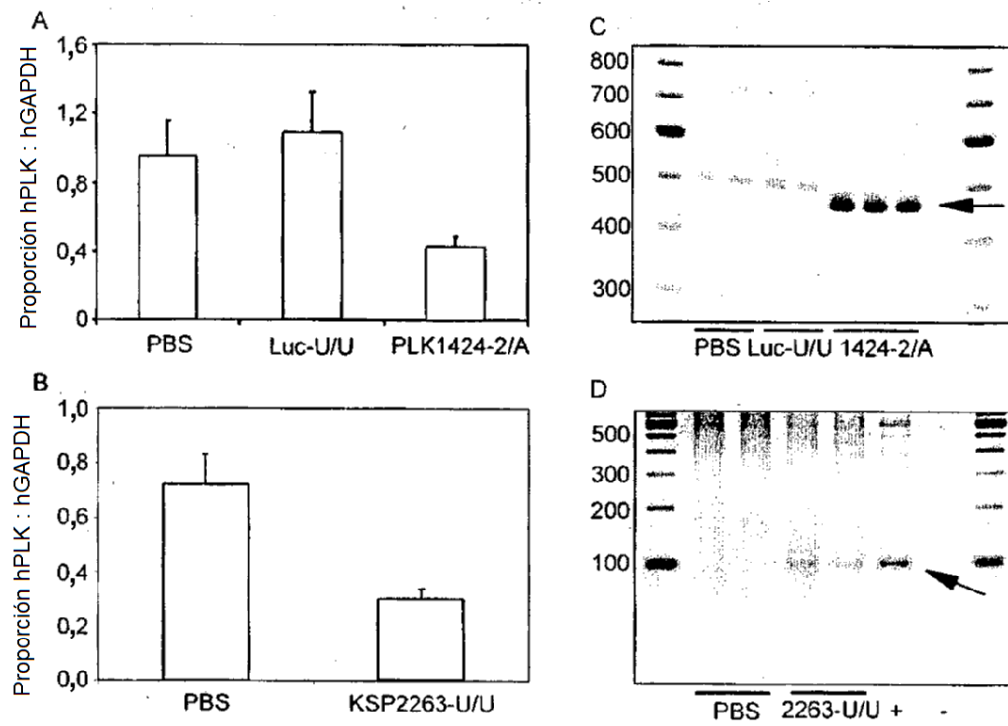


FIG. 33

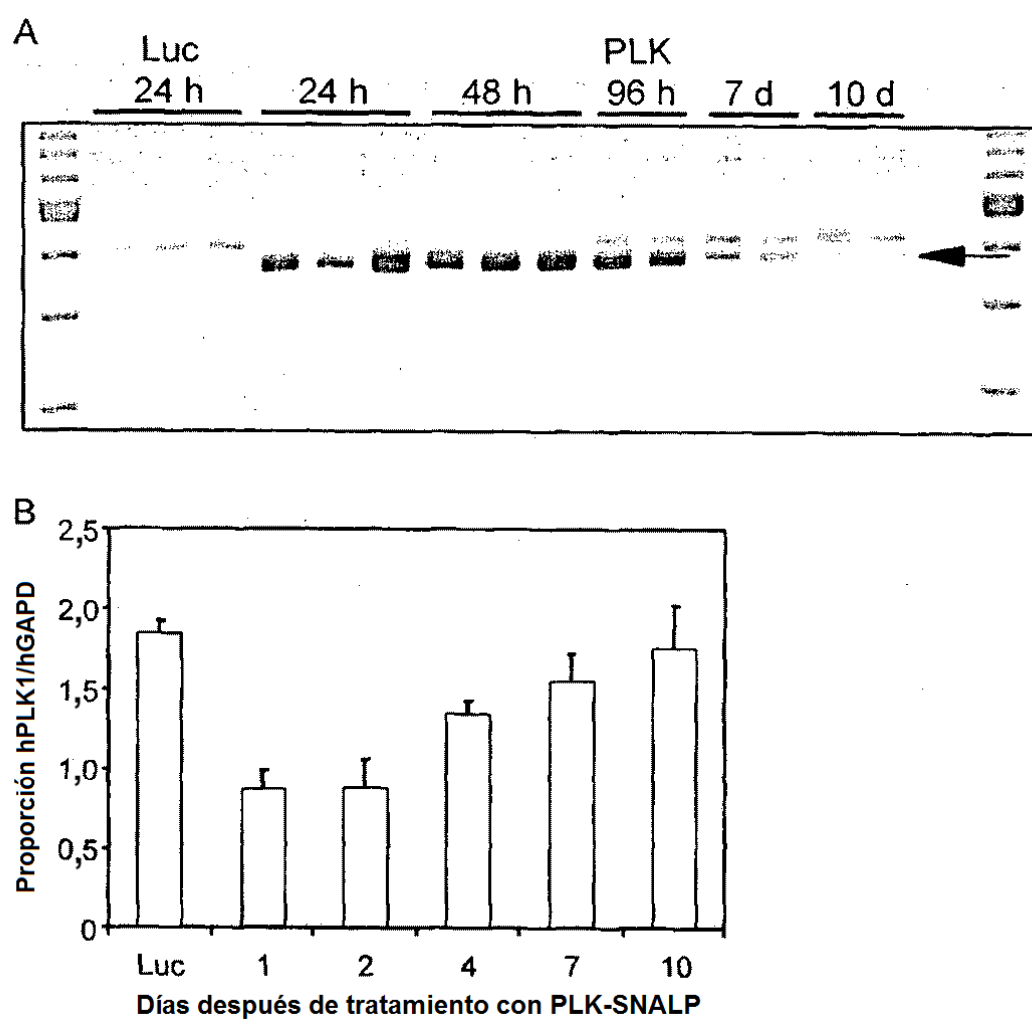


FIG. 34

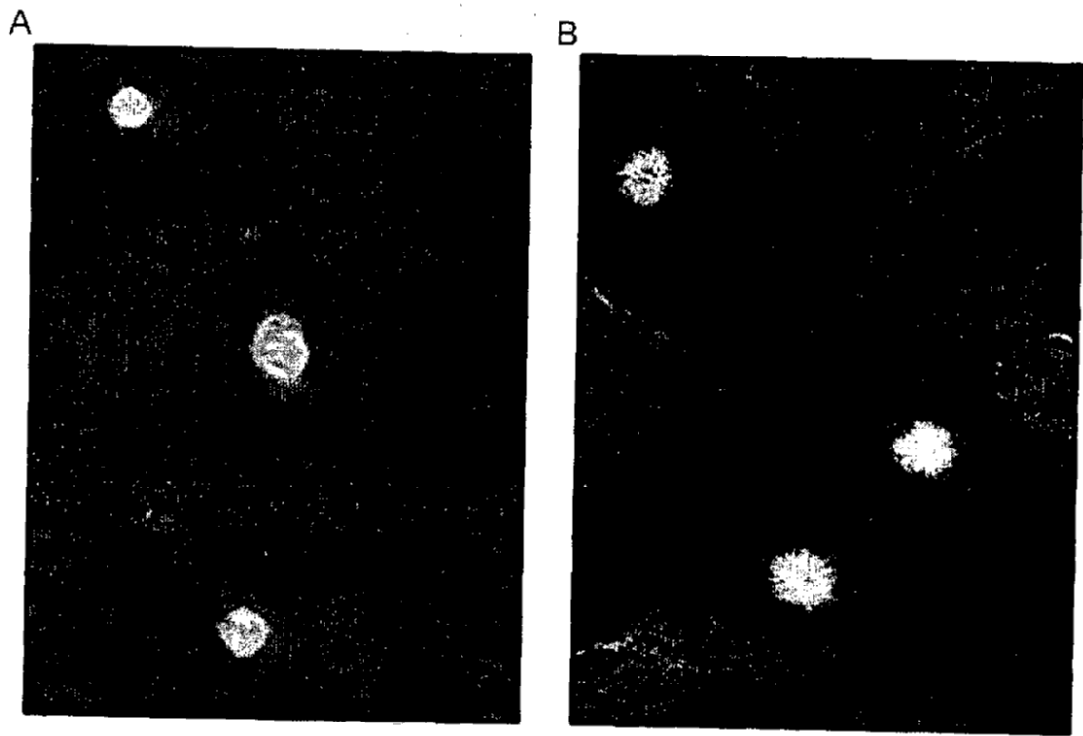


FIG. 35

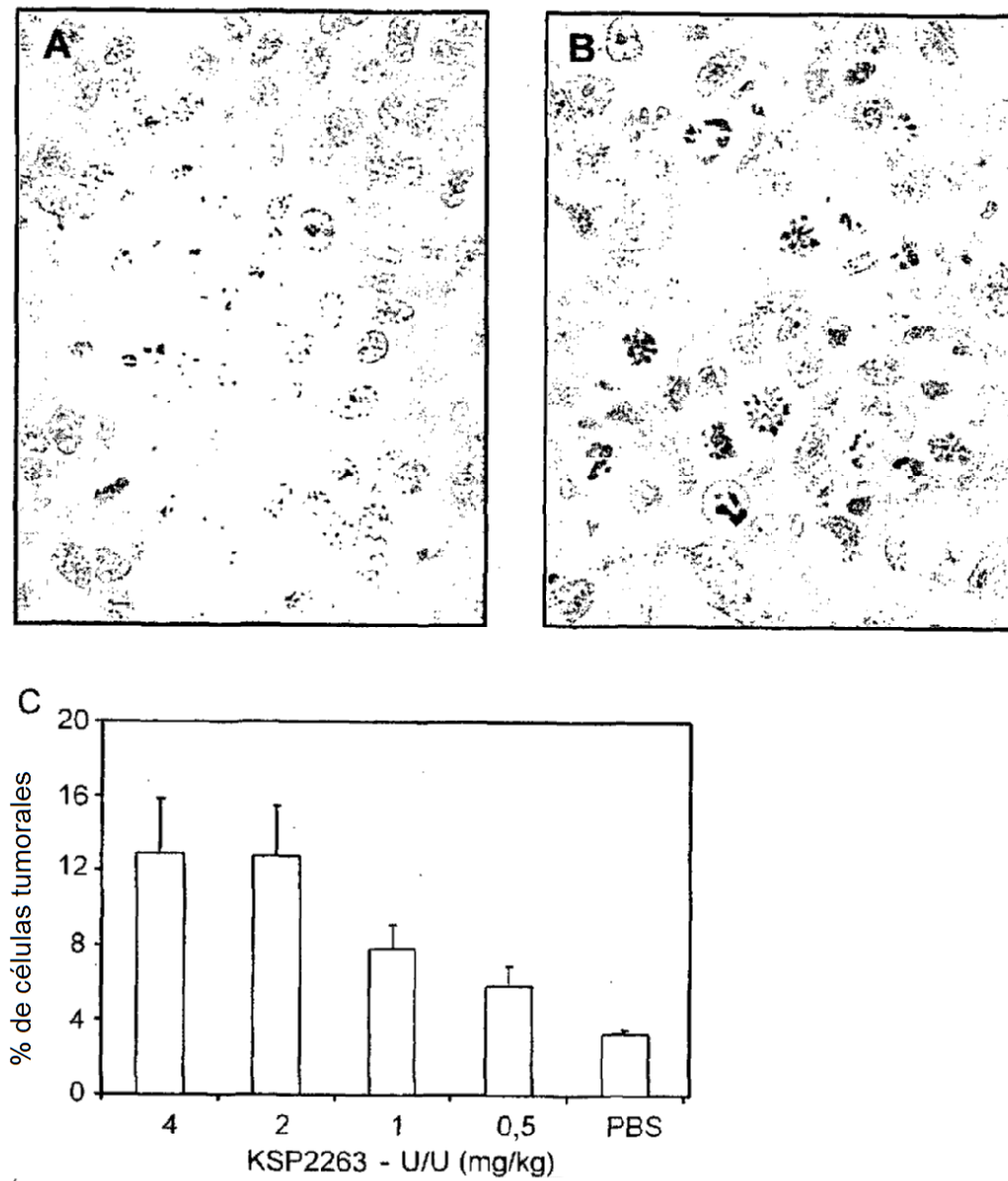


FIG. 36

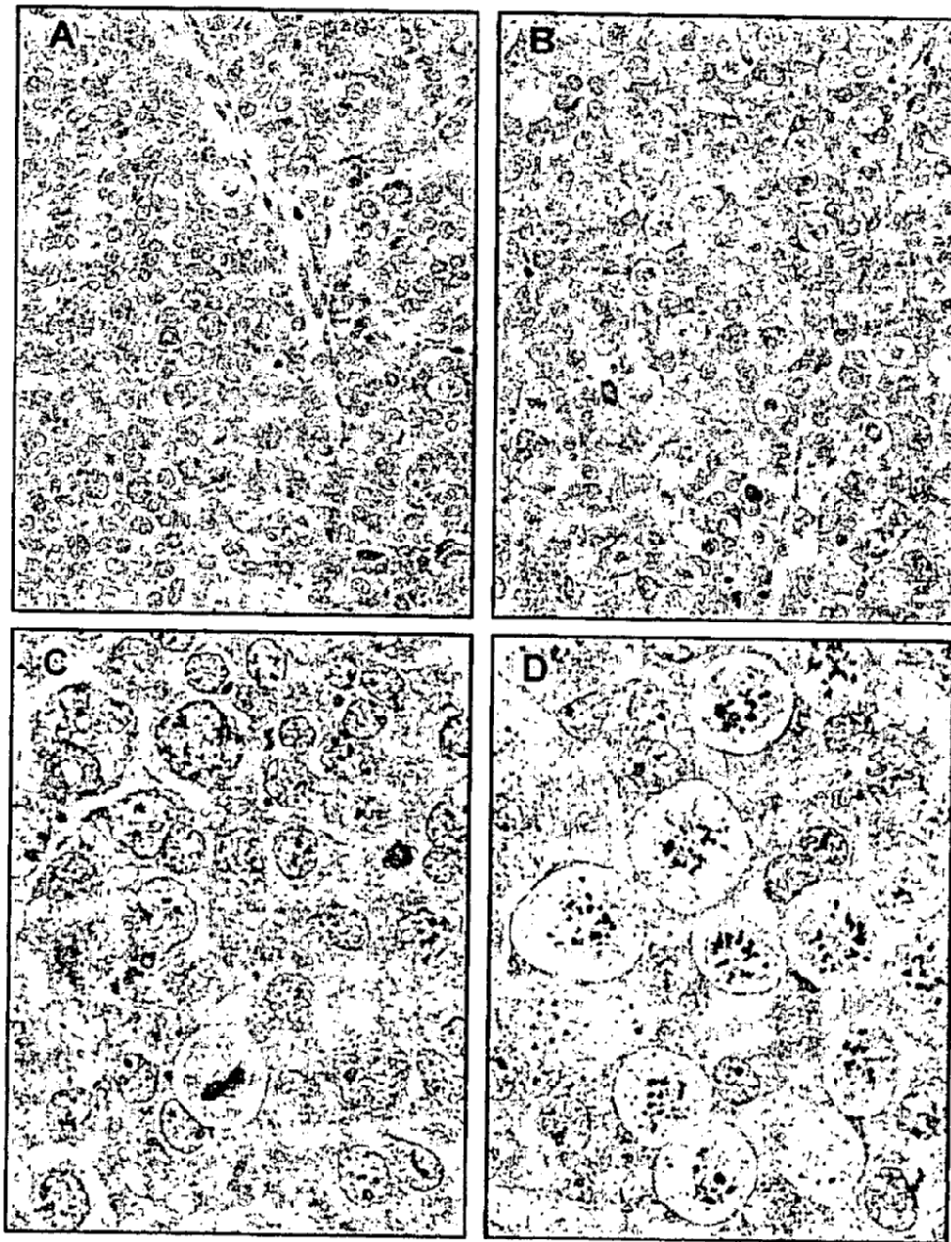


FIG. 37

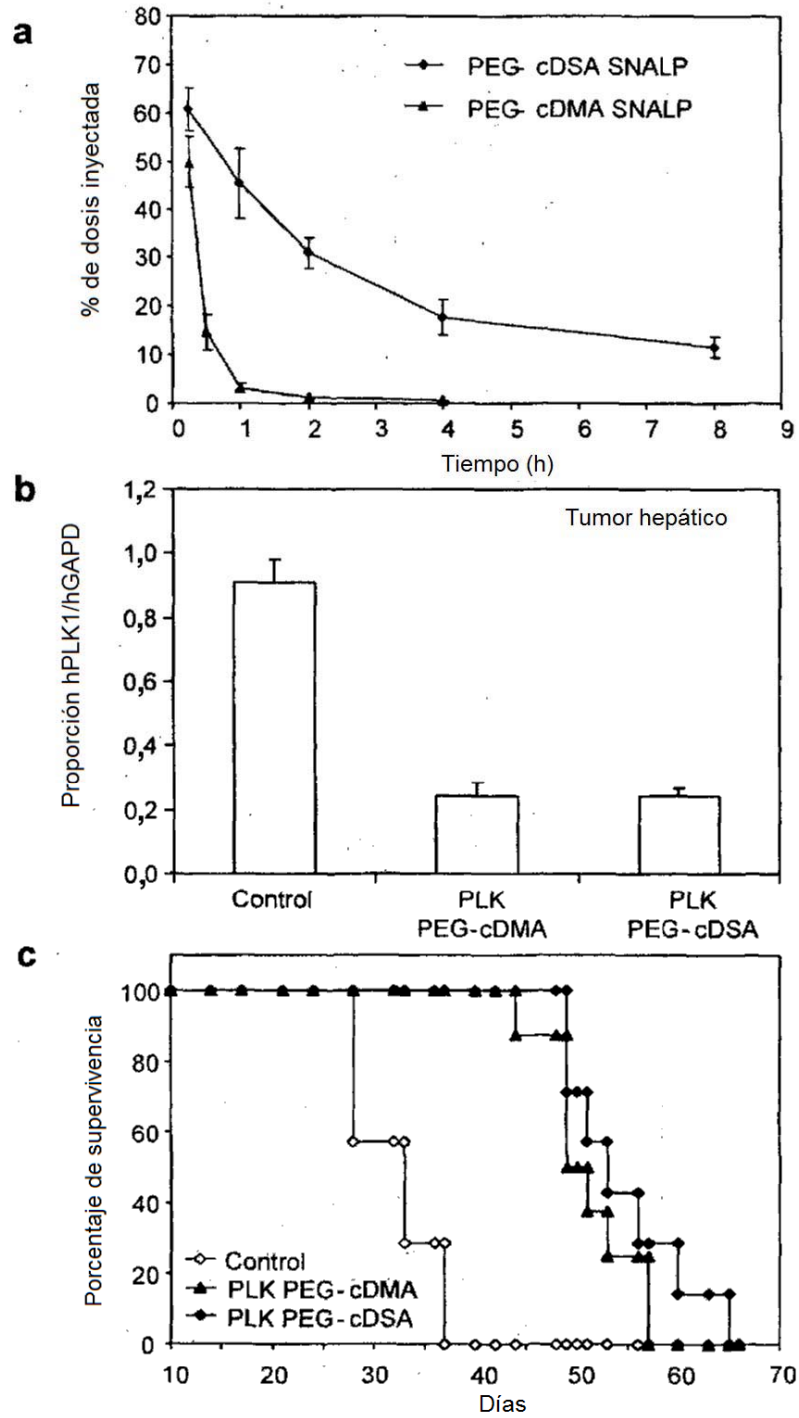


FIG. 38

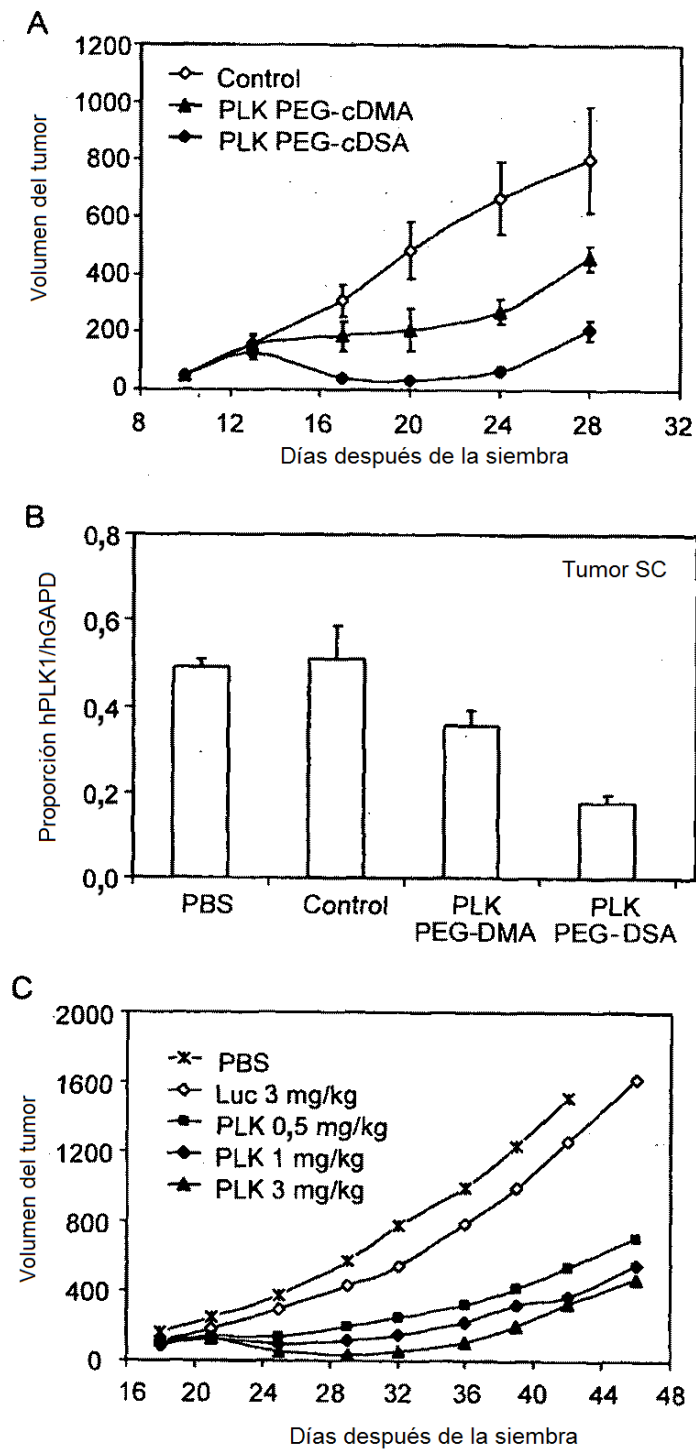


FIG. 39

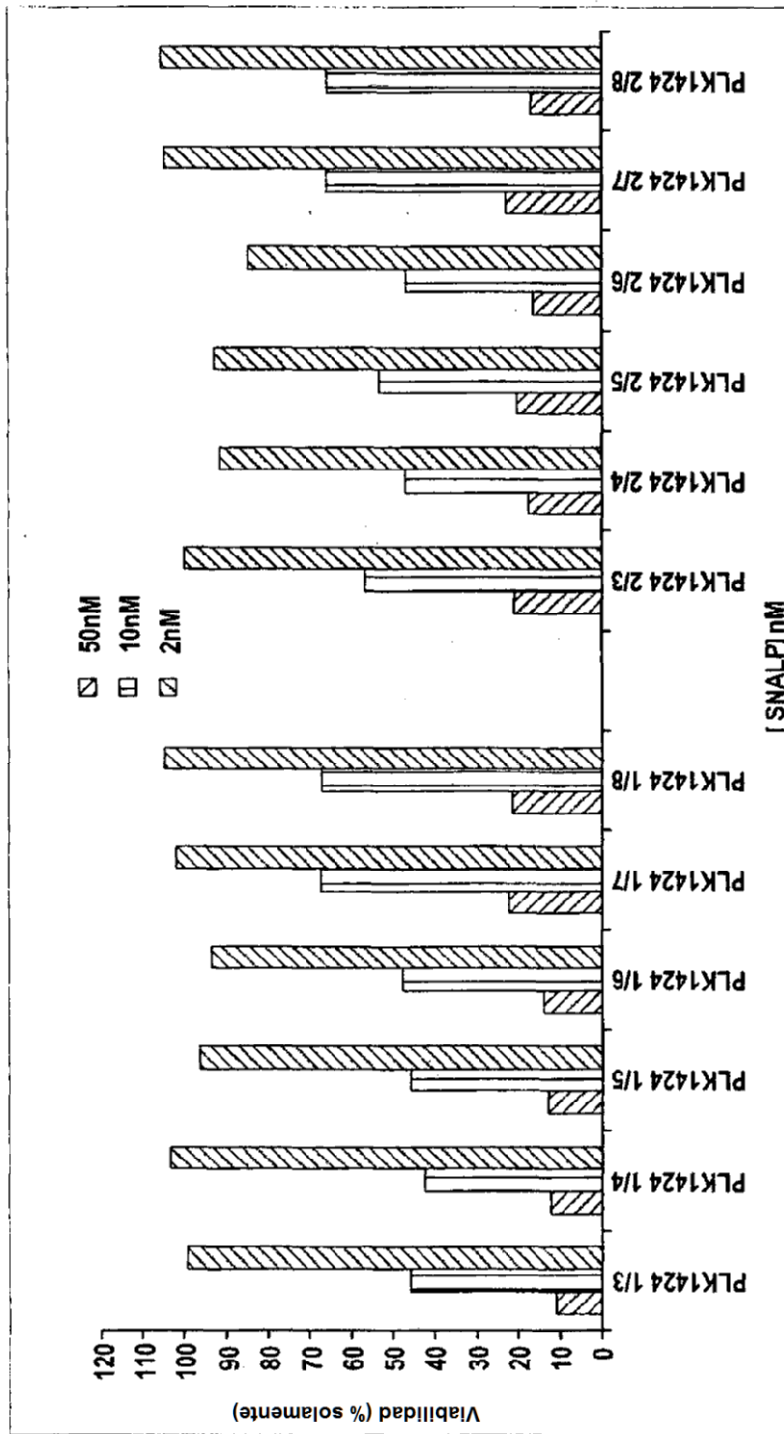


FIG. 40

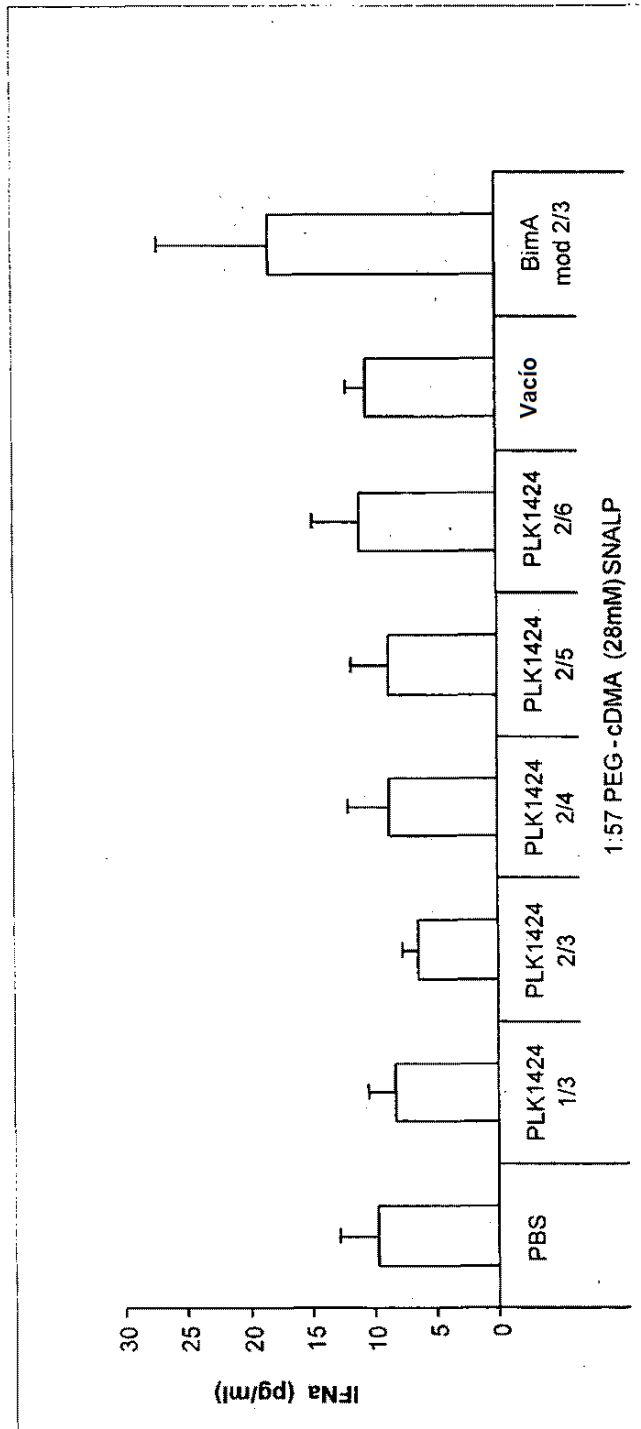


FIG. 41

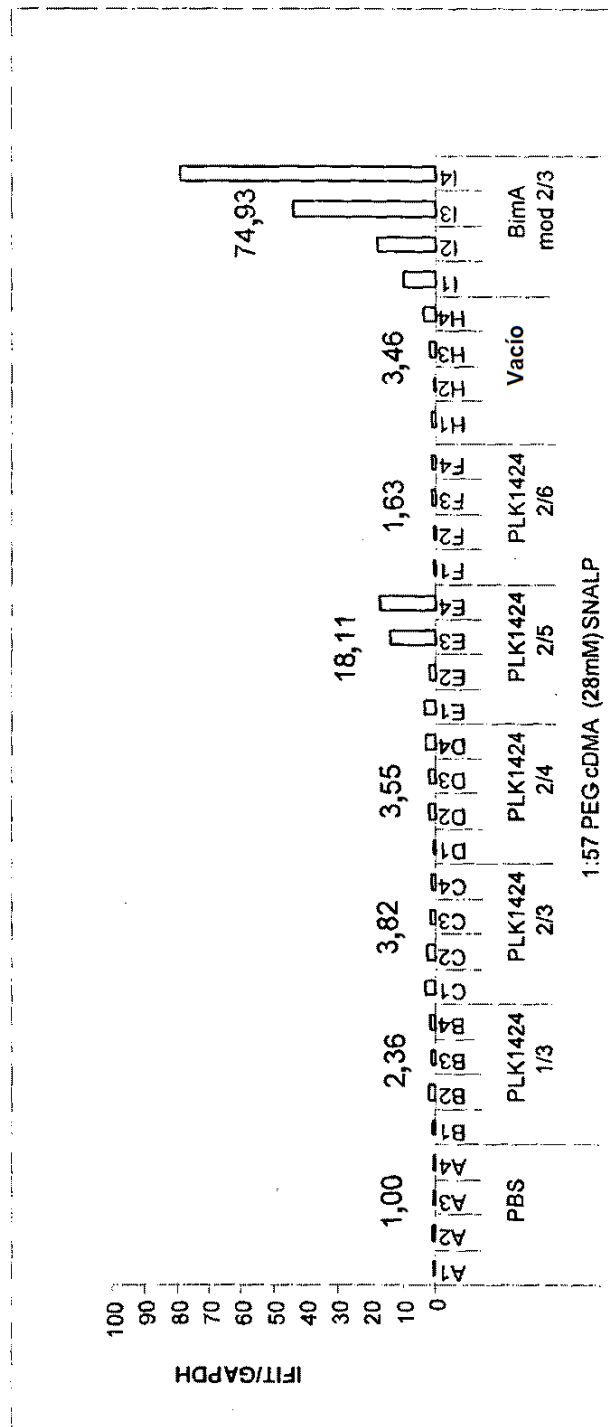


FIG. 42

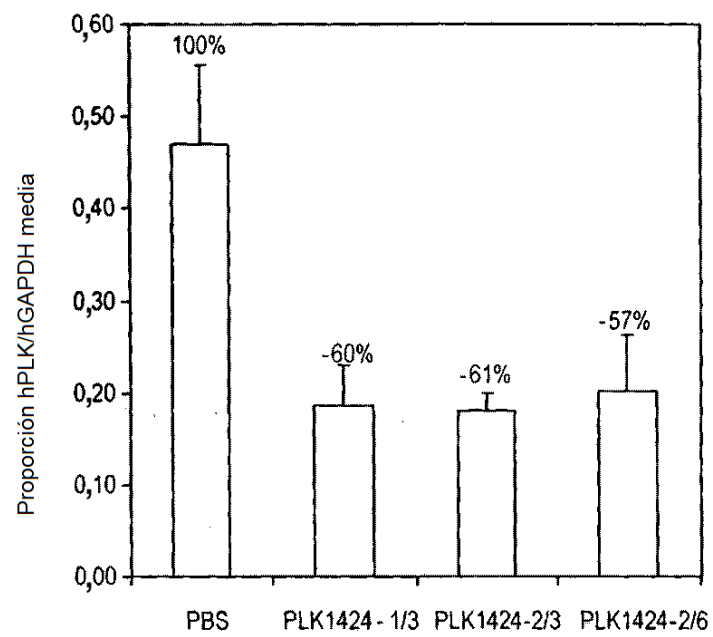


FIG. 43