(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 559 828**

(51) Int. CI.:

A61K 9/127 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2004 E 12191154 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.10.2015 EP 2567693**

(54) Título: **ARN de interferencia encapsulado en lípidos**

(30) Prioridad:

16.07.2003 US 488144 P
15.09.2003 US 503279 P
11.12.2003 US 529406 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2016

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

MACLACHLAN, IAN;
AMBEGIA, ELLEN GRACE y
HEYES, JAMES

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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

ARN de interferencia encapsulado en lípidos

Área de la invención

La presente invención hace referencia a composiciones y métodos para un sistema para la administración terapéutica de un ácido nucleico, administrando un vehículo de administración lipídico estable en suero que encapsula el ácido nucleico para proporcionar un ARN de interferencia (ARNi) eficaz en una célula o en un mamífero. Más en particular, la presente invención hace referencia a la utilización de un ARN de interferencia pequeño (siARN) encapsulado en una partícula lipídica estable en suero con un diámetro pequeño, adecuada para la administración sistémica.

Antecedentes de la invención

El ARN de interferencia (ARNi) es un mecanismo conservado evolutivamente, de secuencia específica activado por un ARN de doble cadena (ARNbc) que induce a la degradación del ARNm de cadena única complementario y el "silenciamiento" de las correspondientes secuencias traducidas (McManus y Sharp, Nature Rev. Genet. 3:737 (2002)). El ARNi funciona mediante el corte enzimático de cadenas de ARNbc más largas en secuencias de "ARN pequeño de interferencia" (siARN) biológicamente activas de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud (Elbashir, et al., Genes Dev. 15:188 (2001)). El siARN puede utilizarse para regular por disminución o silenciar la traducción del producto génico de interés. Por ejemplo, resulta deseable regular por disminución los genes asociados con diversas enfermedades y trastornos.

La administración del siARN sigue siendo problemática (ver, por ejemplo, Novina y Sharp, Nature 430::161-163 (2004); y Garber, J. Natl. Cancer Inst. 95(7):500-2 (2003)). Se requiere de un sistema de administración de ácido nucleico seguro y efectivo para que el siARN sea terapéuticamente útil. El ARNbc desnudo administrado en la mayoría de los sujetos: (1) será degradado por nucleasas endógenas; y (2) no será capaz de atravesar las membranas celulares para entrar en contacto con, y silenciar, las secuencias de genes diana.

Los vectores virales son sistemas de administración de genes relativamente eficaces, pero adolecen de una serie de factores que preocupan en cuanto a la seguridad, tales como poseer un potencial para respuestas inmunes no deseadas. Además, los sistemas virales se eliminan rápidamente de la circulación, lo que limita su transfección a órganos de "primer paso" tales como los pulmones, hígado, y el bazo. Además, estos sistemas inducen respuestas inmunes que comprometen la administración de las inyecciones posteriores. Como resultado, se está prestando mayor atención a sistemas de administración de genes no virales (Worgall, et al., Human Gene Therapy 8:37 (1997); Peeters, et al., Human Gene Therapy 7:1693 (1996); Yei, et al., Gene Therapy 1: 192 (1994); Hope, et al., Molecular Membrane Biology 15:1 (1998)).

Los complejos de plásmidos de ADN-liposomas catiónicos son actualmente los vehículos de administración de genes no virales más comúnmente empleados (Felgner, Scientific American 276:102 (1997); Chonn, et al., Current Opinion in Biotechnology 6:698 (1995)). Por ejemplo, se revelan complejos de liposomas catiónicos realizados a partir de un compuesto anfipático, un lípido neutro, y un detergente para transfectar células de insectos en la Patente estadounidense Nº 6.458.382. También se revelan complejos de liposomas catiónicos en la Publicación de la Solicitud de Patente estadounidense Nº 2003/0073640. Los complejos de liposomas catiónicos, sin embargo, son sistemas grandes mal definidos que no son adecuados para aplicaciones sistémicas y pueden suscitar considerables efectos secundarios tóxicos (Harrison, et al., Biotechniques 19:816 (1995); Li, et al., The Gene 4:891 (1997); Tam, et al, Gene Ther. 7:1867 (2000)). Como agregados grandes y cargados positivamente, los lipoplejos se eliminan rápidamente cuando se administran *in vivo*, con los niveles de expresión más elevados observados en órganos de primer paso, en particular en los pulmones (Huang, et al., Nature Biotechnology 15:620 (1997); Templeton, et al., Nature Biotechnology 15:647 (1997); Hofland, et al., Pharmaceutical Research 14:742 (1997)).

Otros sistemas de administración liposomales incluyen, por ejemplo, el uso de liposomas de micelas inversas, aniónicos y poliméricos según se revela en, *por ejemplo*, la Patente estadounidense Nº 6.429.200; Solicitud de patente estadounidense Nº 2003/0026831; y Solicitudes de patente estadounidenses Nos. 2002/0081736 y 2003/0082103, respectivamente.

Un trabajo reciente ha mostrado que los ácidos nucleicos pueden encapsularse en "partículas lipídicas-plásmido estabilizadas" (SPLP, por sus siglas en inglés) pequeñas (de aproximadamente 70 nm de diámetro) que consisten en un único plásmido encapsulado dentro de una vesícula de bicapa lipídica (Wheeler, et al., Gene Therapy 6:271 (1999)). Estas SPLP contienen habitualmente el lípido "fusogénico" dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), niveles bajos de lípido catiónico (es decir, 10% o menos), y se estabilizan en medios acuosos por la presencia de un recubrimiento de poli(etilenglicol) (PEG). Las SPLP tienen aplicación sistemática ya que muestran tiempos de vida en la circulación extendidos después de una inyección por vía intravenosa (i.v.), se acumulan preferentemente en

sitios tumorales distales debido al incremento de la permeabilidad vascular en dichas regiones, y pueden mediar en la expresión de transgenes en estos sitios tumorales. Los niveles de expresión de transgenes observados en el sitio tumoral a continuación de la inyección i.v. de las SPLP que contienen el gen marcador luciferasa son superiores a los niveles que pueden lograrse empleando complejos de plásmido de ADN-liposoma catiónico (lipoplejos) o ADN desnudo.

Sin embargo, persiste una fuerte necesidad en el arte de métodos y composiciones novedosas y más eficaces para la introducción de ácidos nucleicos, tales como el siARN, en las células. La presente invención aborda esta y otras necesidades. En Paul et al., (Nat Biotech 2002, vol 20, págs. 505-508) se describe la expresión efectiva del ARN de interferencia pequeño en células humanas. La patente WO 02/087541 A1 describe formulaciones a base de lípidos para la transferencia de genes. En Krichevsky et al., (PNAS 2002, vol 99, págs. 11926-11929) describe ARNi en neuronas de mamíferos cultivadas.

Breve resumen de la invención

Se describe en la presente patente partículas estables de ácidos nucleicos-lípidos (SNALP, por sus siglas en inglés) de utilidad para encapsular una o más moléculas de siARN, métodos para la realización de SNALP que comprenden siARN, SNALP que comprenden siARN y métodos de sistemas de administración y/o administración de las SNALP a un sujeto para silenciar la expresión de una secuencia de genes diana.

También se describe en la presente patente partículas de ácidos nucleicos-lípidos que comprenden: un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas y un siARN. La presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido para su uso en la administración *in vivo* de un siARN en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, donde dicho método comprende la administración de dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un sujeto mamífero, donde dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende: un siARN; un lípido catiónico; un lípido no catiónico; y un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido; en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido. En algunos modos de realización, la molécula de siARN se encuentra totalmente encapsulada dentro de la bicapa lipídica de la partícula de ácido nucleico-lípido, de tal manera que el ácido nucleico en la partícula de ácido nucleico-lípido es resistente en solución acuosa a la degradación por una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos. La molécula de siARN puede comprender de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos. La molécula de siARN puede obtenerse a partir de un ARN de doble cadena mayor de 25 nucleótidos de longitud. En algunos modos de realización, el siARN se transcribe a partir de un plásmido que comprende un molde de ADN de una secuencia diana.

El lípido catiónico puede ser uno o más de cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), y N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), y una mezcla de los mismos. El lípido no catiónico puede ser uno o más de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, y combinaciones de los mismos.

El lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas es un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido. El conjugado de PEG-lípido puede ser uno o más de PEG-dialquiloxipropilo (DAA), PEG-diacilglicerol (DAG), PEG-fosfolípidos, PEG-ceramida, y combinaciones de los mismos. El conjugado PEG-DAG puede ser uno o más de PEG-dilauroilglicerol (C_{12}), PEG-dimiristoilglicerol (C_{14}), PEG-dipalmitoilglicerol (C_{16}), y PEG-diesteraoilglicerol (C_{18}), y combinaciones de los mismos. El conjugado de PEG-DAA puede ser uno o más de PEG-dilauriloxipropilo (C_{12}), PEG-dimiristiloxipropilo (C_{14}), PEG-dipalmitiloxipropilo (C_{16}), y PEG-diestheariloxipropilo (C_{18}), y combinaciones de los mismos. La partícula de ácido nucleico-lípido puede además comprender un lípido polimérico catiónico.

En algunos modos de realización, las partículas se realizan proporcionando una solución acuosa en un primer depósito y una solución lipídica orgánica en un segundo depósito, y mezclando la solución acuosa con la solución lipídica orgánica para sustancialmente producir de forma instantánea un liposoma que encapsula un ARN de interferencia. En algunos modos de realización, las partículas se realizan mediante formación de complejos intermedios hidrófobos en sistemas a base de detergente o bien a base de disolvente, seguido de la eliminación del detergente o disolvente orgánico. Los modos de realización preferidos son de carga neutra.

En un modo de realización, el ARN de interferencia se transcribe a partir de un plásmido y el plásmido se combina con lípidos catiónicos en una solución detergente para proporcionar un complejo de ácido nucleico-lípido recubierto. El complejo se pone en contacto a continuación con lípidos no catiónicos para proporcionar una solución detergente, un complejo de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos, y el detergente a continuación se retira para proporcionar una solución de partículas de ácido nucleico-lípido estable en suero, en las que el plásmido que comprende un molde de ARN de interferencia se encapsula en una bicapa lipídica. Las partículas formadas de ese modo tienen un tamaño de aproximadamente 50-150 nm.

En otro modo de realización, las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero se forman preparando una mezcla de lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos en un disolvente orgánico; poniendo en contacto una solución acuosa de ácidos nucleicos que comprenden ARN de interferencia con la mezcla de lípidos catiónicos y no catiónicos para proporcionar una fase única transparente; y retirando el disolvente para proporcionar una suspensión de partículas de ácido nucleico-lípido, en la que el ácido nucleico se encapsula en una bicapa lipídica, y las partículas son estables en suero y tienen un tamaño de aproximadamente 50-150 nm.

Las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención son de utilidad para la administración terapéutica de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de siARN. En particular, en la presente patente se describen métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad en un mamífero regulando por disminución o silenciando la traducción de una secuencia de ácido nucleico diana. En estos métodos, una molécula de siARN se formula en forma de partícula de ácido nucleico-lípido, y las partículas se administran a pacientes que requieren de un tratamiento de este tipo (por ejemplo, un paciente diagnosticado con una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o sobreexpresión de un gen que comprende la secuencia de ácido nucleico diana). De forma alternativa, se extraen células de un paciente, el siARN se administra *in vitro*, y las células se reinyectan en el paciente. En la presente patente se describe un método de introducción de la molécula de siARN en una célula poniendo en contacto una célula con una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación, y un siARN.

La presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: un siARN; un lípido catiónico; un lípido no catiónico; y un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido; en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido, para su uso en el silenciamiento de la expresión de una secuencia diana en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, donde dicho método comprende administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un sujeto mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva.

La presente invención proporciona además una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: un siARN; un lípido catiónico; un lípido no catiónico; y un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido; en donde dicho siARN se encuentra totalmente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido, para su uso en un método para tratar una enfermedad en un sujeto mamífero, donde dicho método comprende de administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a dicho sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva, en donde dicha enfermedad está asociada a la expresión de un gen que comprende una secuencia diana para dicho siARN.

La presente invención proporciona adicionalmente el uso de una partícula de ácido nucleico-lípido para la elaboración de una composición para introducir un siARN en una célula, en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, en donde dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende: un siARN; un lípido catiónico; un lípido no catiónico; y un conjugado polietilenglicol (PEG)-lípido; en donde dicho siARN se encuentra totalmente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido.

La invención además proporciona el uso de una partícula de ácido nucleico-lípido para la elaboración de un medicamento para: (I) el silenciamiento de la expresión de una secuencia diana en un sujeto mamífero, en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, (II) la administración *in vivo* de un siARN en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, o (III) el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mamífero, en donde dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende: un siARN; un lípido catiónico; un lípido no catiónico; y un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido; en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido.

La partícula de ácido nucleico-lípido puede ser administrada, *por ejemplo*, por vía intravenosa, parenteral o intraperitoneal. En un modo de realización, al menos aproximadamente un 10% de la dosis total administrada de las partículas de ácido nucleico-lípido está presente en plasma aproximadamente 24, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas después de la inyección. En otros modos de realización, más del 20%, 30%, 40% y hasta el 60%, 70% u 80% de la dosis total inyectada de las partículas de ácido nucleico-lípido está presente en plasma 24,36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas después de la inyección. En un modo de realización, la presencia de un siARN en células de un tejido diana (*es decir*, pulmón, hígado, un tumor o en un sitio de inflamación) es detectable a las 24, 48, 72 y 96 horas después de su administración. En un modo de realización, la regulación por disminución de la expresión de la secuencia diana es detectable 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración. En un modo de realización, la regulación por disminución de la expresión de la secuencia diana tiene lugar, de manera preferente, en células tumorales o en células en un sitio de inflamación. En un modo de realización, la presencia de un siARN en células en un sitio distal al sitio de administración es detectable al menos cuatro días después de la inyección intravenosa de la partícula de ácido nucleico-lípido. En otro modo de realización, la presencia de un siARN en células de un tejido diana (*es decir*, pulmón, hígado, un tumor o en un sitio de inflamación) es detectable al menos cuatro días después de la inyección de la partícula de ácido nucleico-lípido.

Las partículas son adecuadas para su uso en transferencia de ácido nucleico intravenoso, ya que son estables en la circulación, de un tamaño requerido para su comportamiento farmacodinámico, lo que tiene como resultado un

acceso a sitios extravasculares y a poblaciones de células diana. También se describe en la presente patente composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una partícula de ácido nucleico-lípido.

Se describe en la presente patente métodos para la administración *in vivo* del siARN. Una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas, y siARN se administra (*por ejemplo*, por vía intravenosa, intraperitoneal, o subdérmica) a un sujeto (*por ejemplo*, un mamífero tal como un humano). Además se describen en la presente patente métodos para la administración *in vivo* de ARN de interferencia al hígado de un sujeto mamífero.

Se describe adicionalmente en la presente patente un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mamífero. Una cantidad terapéuticamente efectiva de una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende un lípido catiónico, un lípido no catiónico, un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas, y siARN se administra al sujeto mamífero (*por ejemplo*, un roedor tal como un ratón, un primate tal como un humano o un mono), con la enfermedad o trastorno. En algunos modos de realización, la enfermedad o trastorno está asociado con la expresión y/o sobreexpresión de un gen, y la expresión o sobreexpresión del gen se silencia mediante el siARN. En algunos modos de realización, la enfermedad es una enfermedad vírica tal como, por ejemplo, hepatitis (*por ejemplo*, Hepatitis A, Hepatitis B, Hepatitis C, Hepatitis D, Hepatitis E, Hepatitis G, o una combinación de las mismas). En un modo de realización, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno del hígado, tal como por ejemplo, dislipidemia.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra la regulación por disminución de la expresión de la β-galactosidasa en células CT26.CL25 a través de la administración *in vitro* del siARN anti-β-galactosidasa encapsulado en liposomas de DSPC:Colesterol:DODMA:PEG-DMG.

La Figura 2 ilustra las estructuras de los PEG-Diacilgliceroles y PEG-Ceramida C_{20}.

La Figura 3 ilustra que los estudios de aclaramiento con LUV mostraron que las SNALP que contenían PEG-DAG fueron comparables a las SNALP que contienen PEG-CeramidaC20.

La Figura 4 ilustra que las SNALP que contienen PEG-DAG pueden ser formuladas a través de un método de diálisis con detergente.

La Figura 5 ilustra las propiedades farmacocinéticas de las SNALP que contienen PEG-DAG.

La Figura 6 ilustra las propiedades de biodistribución de las SNALP que contienen PEG-DAG.

La Figura 7 ilustra la expresión del gen luciferasa 24 horas después de la administración por vía I.V. de las SPLP que contienen PEGCeramidaC_{20} versus PEG-DAG en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a.

La Figura 8 ilustra la expresión del gen luciferasa 48 horas después de la administración por vía I.V. de SPLP que contienen PEG-CeramidaC_{20} versus PEG-DAG en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a.

La Figura 9 ilustra la expresión del gen luciferasa 72 horas después de la administración I.V. de SPLP que contienen PEG-CeramidaC_{20} versus PEG-DAG en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a.

La Figura 10 ilustra las estructuras de tres ejemplos de derivados de PEG-dialquiloxipropilo adecuados para su uso en la presente invención, *es decir*, N-(2,3-dimiristiloxipropil) carbamato PEG_{2000} metil éter (*es decir*, PEG-C-DMA), N-(2,3-dimiristiloxipropil) amida PEG_{2000} metil éter (es decir, PEG-A-DMA), y N-(2,3-dimiristiloxipropil) succinamida PEG_{2000} metil éter (*es decir*, PEG-S-DMA).

La Figura 11 ilustra datos que muestran la expresión de genes de luciferasa en tumores 48 horas después de la administración por vía intravenosa de SPLP que comprende conjugados de PEG-DAA y PEG-DAG.

La Figura 12 ilustra datos que muestran la expresión de genes en luciferasa en el hígado, pulmón, bazo, corazón y en tumores tras la administración intravenosa de SPLP que comprenden conjugados de PEG-DAA y conjugados de PEG-DAG.

La Figura 13 ilustra datos de estudios de aclaramiento en ratones A/J portadores de neuroblastoma Neuro-2a después de la administración de SPLP que comprende un conjugado de PEG-DAA y que contiene un plásmido que codifica la luciferasa bajo el control del promotor de CMV y SNALP que comprende un conjugado de PEG-DAA y que contiene siARN anti-luciferasa.

La Figura 14 ilustra datos de estudios de las propiedades farmacocinéticas de las SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, y las SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a.

La Figura 15 ilustra datos de estudios de aclaramiento en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a tumor después de la administración de SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA o un conjugado de PEG-DAG y que contiene un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, pSPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAG y que contienen un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa.

La Figura 16 ilustra datos de estudios de las propiedades farmacocinéticas de las SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA o un conjugado de PEG-DAG y que contiene un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, pSPLP que comprende un conjugado de PEG-DAG y que contiene un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor CMV y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contiene anti-luciferasa siARN en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a.

La Figura 17 ilustra datos *in vitro* que demuestran el silenciamiento de la expresión de luciferasa en células que expresan luciferasa tratadas con SPLP que comprenden un conjugado de PEG-lípido y que contienen un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-lípido y que contienen siARN anti-luciferasa.

La Figura 18 ilustra datos *in vivo* que demuestran el silenciamiento de la expresión de luciferasa en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a tratados con SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa.

La Figura 19 ilustra datos *in vivo* que demuestran el silenciamiento de la expresión de luciferasa en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a tumor tratados con SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa.

La Figura 20 ilustra datos *in vivo* que demuestran el silenciamiento de la expresión de luciferasa en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a tratados con un conjugado de PEG-DAA y que contiene un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa.

La Figura 21 ilustra datos *in vivo* que demuestran el silenciamiento de la expresión de luciferasa en ratones A/J machos portadores de neuroblastoma Neuro-2a tratados con SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA, y que contienen un plásmido que codifica la luciferasa bajo el control del promotor de CMV, y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa.

La Figura 22 ilustra datos *in vivo* que demuestran el silenciamiento de la expresión de luciferasa en ratones A/J portadores de neuroblastoma Neuro-2a tratados con SPLP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contiene un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV, y SNALP que comprenden un conjugado de PEG-DAA y que contienen siARN anti-luciferasa.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

Se describe en la presente patente partículas de ácido nucleico-lípido estables (SNALP) de utilidad para encapsular una molécula de siARN, métodos de elaboración de SNALP que comprenden siARN, SNALP que comprenden siARN y métodos para un sistema de administración y/o la administración de las SNALP a un sujeto para silenciar la expresión de una secuencia de genes diana.

La presente invención se basa en el inesperado éxito de la encapsulación de moléculas de ARN de interferencia pequeño (siARN) en SNALP. Utilizando los métodos descritos en la presente patente, las moléculas de siARN se encapsulan en las SNALP con una eficacia mayor al 70%, más usualmente con una eficacia mayor de un 80 a 90%. Las SNALP descritas en la presente patente pueden ser utilizadas de forma conveniente *in vitro* e *in vivo* para administrar de forma eficaz moléculas de siARN localmente o sistemáticamente a células que expresan un gen diana. Una vez administradas, las moléculas de siARN en las SNALP silencian la expresión del gen diana.

Las SNALP descritas en la presente patente son habitualmente de < 150 nm de diámetro y permanecen intactas en la circulación durante un periodo de tiempo prolongado para lograr la administración del siARN a los tejidos diana. Las SNALP son partículas que contienen ácido nucleico resistente al suero que no interactúa con células y otros componentes del compartimento vascular. Más aún, las SNALP además interactúan fácilmente con células diana en el sitio con la enfermedad para facilitar la administración intracelular de un ácido nucleico deseado (*por ejemplo*, un siARN o un plásmido que codifica un siARN).

II. Definiciones

El término “lípido” hace referencia a un grupo de compuestos orgánicos que incluyen, pero no se limitan a, ésteres de ácidos grasos y se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Se dividen habitualmente en al menos tres clases: (1) "lípidos simples que incluyen grasas y aceites además de ceras; (2) "lípidos compuestos ", que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; (3) "lípidos derivados" tales como esteroides.

“Vesícula lipídica” hace referencia a cualquier composición lipídica que puede ser utilizada para administrar un compuesto que incluye, pero sin limitarse a ello, liposomas, en donde se encapsula un volumen acuoso mediante una bicapa lipídica anfipática; o en donde los lípidos recubren un interior que comprende un componente molecular grande, tal como un plásmido que comprende una secuencia de ARN de interferencia, con un interior acuoso reducido; o agregados o micelas lipídicos, en donde el componente encapsulado se encuentra contenido dentro de una mezcla lipídica relativamente desordenada.

Tal como se utiliza en la presente patente, “lípido encapsulado” puede hacer referencia a una formulación lipídica que proporciona un compuesto con una encapsulación completa, encapsulación parcial o ambas. En un modo de realización preferido, el ácido nucleico se encuentra completamente encapsulado en la formulación lipídica.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término "SNALP" hace referencia a una partícula de ácido nucleico-lípido estable. Una SNALP representa una vesícula de lípidos que recubren un interior acuoso reducido que comprende un ácido nucleico tal como una secuencia de ARN de interferencia o un plásmido a partir del cual se transcribe un ARN de interferencia.

El término “lípido formador de vesículas” pretende incluir cualquier lípido anfipático que tenga una fracción hidrófoba y un grupo de cabeza polar, y que por sí mismo pueda conformarse de forma espontánea en vesículas bicapas en agua, tal como se ve ejemplificado en la mayoría de los fosfolípidos.

El término “lípido que adopta la forma de una vesícula” pretende incluir cualquier lípido anfipático que se incorpora a las bicapas lipídicas en combinación con otros lípidos anfipáticos, con su fracción hidrófoba en contacto con la región interior hidrófoba de la membrana bicapa, y su fracción del grupo de cabeza polar orientada hacia la superficie exterior polar de la membrana. Lípidos que adoptan la forma de vesículas que, por sí mismos, tienden a adoptar una fase no lamelar, y que sin embargo son capaces de asumir una estructura bicapa en presencia de un componente estabilizador bicapa. Un ejemplo típico es DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina). Los componentes bicapa estabilizadores incluyen, pero no se limitan a, lípidos conjugados que inhiben la agregación de SNALP, oligómeros de poliamida (*por ejemplo*, derivados de ATTA-lípidos), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos, derivados de PEG-lípidos tales como PEG acoplado a dialquiloxipropilos, PEG acoplado a diacilgliceroles, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, y PEG conjugado con ceramidas (ver, la patente estadounidense Nº 5.885.613).

El término “lípido anfipático” hace referencia, en parte, a cualquier material adecuado en donde la parte hidrófoba del material lipídico se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras que la parte hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Los lípidos anfipáticos son habitualmente el componente principal de la vesícula lipídica. Las características hidrófilas se obtienen a partir de la presencia de grupos polares o cargados tales como grupos de carbohidratos, fosfato, carboxílicos, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxi y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede ser conferida mediante la inclusión de grupos polares que incluyen, pero sin limitarse a, grupos hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos sustituidos por uno o más grupos aromáticos cicloalifáticos o heterocíclicos. Ejemplos de compuestos anfifáticos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como las familias de esfingolípidos, glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y beta-aciloxiácidos, se encuentran también dentro del grupo designado como lípidos anfipáticos. Adicionalmente, el lípido anfipático descrito anteriormente puede mezclarse con otros lípidos incluyendo triglicéridos y esteroles.

El término “lípido neutro” hace referencia a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma zwitteriónica (híbrida) no cargada o neutral en un pH seleccionado. En un pH fisiológico, tales lípidos incluyen, por

ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilgliceroles.

El término "lípido no catiónico " hace referencia a cualquier lípido neutro según se describe anteriormente, además de a lípidos aniónicos.

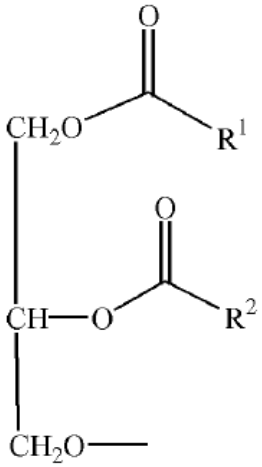
El término “lípido aniónico” hace referencia a cualquier lípido que tenga carga negativa a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, N-dodecanoil fosfatidiletanolaminas, N-succinil fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilgliceroles, palmitoiloleiolfosfatidilglicerol (POPG), y otros grupos de modificación aniónica unidos a lípidos neutros.

El término “lípido catiónico” hace referencia a cualquiera de una serie de especies de lípidos que portan una carga neta positiva a un pH seleccionado, tal como pH fisiológico. Tales lípidos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de N-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio ("DOTMA"); bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de N-(2,3-dioleoiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio ("DOTAP"); 3 -(N-(N’,N’-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol ("DC-Chol") y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxietil amonio ("DMRIE"). Los siguientes lípidos son catiónicos y tienen una carga positiva a un pH por debajo del pH fisiológico: DODAP, DODMA, DMDMA y similares.

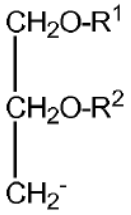
El término “lípido hidrófobo” hace referencia a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a, grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y tales grupos opcionalmente sustituidos por uno o más grupos aromáticos cicloalifáticos o heterocíclicos. Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, diacilglicerol, dialquilglicerol, N-N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

El término “fusogénico” hace referencia a la habilidad de un liposoma, una SNALP u otro sistema de administración del fármaco para fusionarse con membranas de una célula. Las membranas pueden ser la membrana plasmática o membranas que rodean orgánulos, *por ejemplo*, endosoma, núcleo, etc.

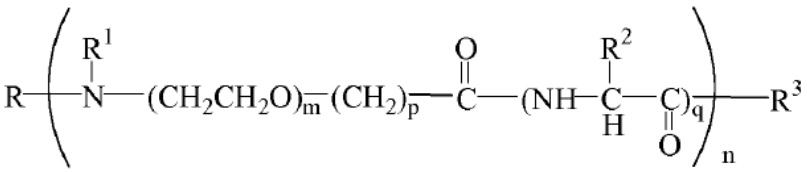
El término "diacilglicerol" hace referencia a un compuesto que tiene 2 cadenas de acilo graso, R^1 y R^2, ambos de los cuales tiene independientemente entre 2 y 30 carbonos enlazados en la posición 1 y 2 del glicerol mediante enlaces éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los diacilgliceroles tienen la siguiente fórmula general:



El término "dialquiloxipropilo" hace referencia a un compuesto que tiene dos cadenas de alquilo, R^1 y R^2, ambas de las cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos. Los grupos alquilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los dialquiloxipropilos tienen la siguiente fórmula general:



El término "ATTA" o "poliamida" hace referencia a, pero no se limita a, compuestos revelados en las patentes estadounidenses Nos. 6.320.017 y 6.586.559. Estos compuestos incluyen un compuesto con la fórmula



en donde: R es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R^1 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; o de manera opcional, R y R^1 y el nitrógeno al que están enlazados forman una fracción azido; R^2 es un miembro del grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y una cadena lateral de un aminoácido; R^3 es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxi, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR^4R^5, en donde R^4 y R^5 son independientemente hidrógeno o alquilo; n es de 4 a 80; m es de 2 a 6; p es de 1 a 4; y q es 0 o 1. Resultará obvio para los expertos en el arte que otras poliamidas pueden ser utilizadas en los compuestos de la presente invención.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" hace referencia a un polímero que contiene al menos dos desoxiribonucleótidos o ribonucleótidos ya sea en una forma de cadena única o de cadena doble. A menos que estén específicamente limitados, los términos abarcan ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de forma similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico en particular también abarca, de forma implícita, variantes de la misma modificadas de forma conservadora (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP, y secuencias complementarias además de la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más (o todos) codones seleccionados se sustituye con residuos de bases mixtas y/o desoxiinosina (Batzer et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); y Cassol et al. (1992); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). Los "Nucleótidos" contienen una a azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base, y un grupo fosfato. Los nucleótidos se encuentran enlazados entre sí a través de grupos fosfato. Las "Bases" incluyen purinas y pirimidinas, que además incluyen los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina, y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero no se limitan a, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos tales como, pero sin limitarse a, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos, y haluros de alquilo. El ADN puede ser una forma antisentido, ADN de un plásmido, partes del ADN de un plásmido, ADN pre-condensado, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico, o derivados de estos grupos. El término ácido nucleico se utiliza de forma intercambiable con un gen, ADNc, ARNm codificado por un gen, y una molécula de ARN de interferencia.

El término “gen” hace referencia a una secuencia de ácido nucleico (*por ejemplo*, ADN o ARN) que comprende secuencias de codificación de longitud parcial o longitud total necesarias para la producción de un polipéptido o un precursor de un polipéptido (*por ejemplo*, polipéptidos o precursores de polipéptidos del virus de la hepatitis A, B, C, D, E, o G; o virus del herpes simple).

El término “producto génico” tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un producto de un gen tal como un transcrito de ARN, incluyendo, *por ejemplo*, ARNm.

El término “ARN de interferencia” o “ARNi” o “secuencia de ARN de interferencia” hace referencia a un ARN de doble cadena (*es decir*, ARN dúplex) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen diana (*es decir*, mediando en la degradación de ARNm que son complementarios a la secuencia del ARN de interferencia), cuando el ARN de interferencia se encuentra en la misma célula que el gen diana. El ARN de interferencia hace referencia,

por tanto, al ARN de cadena doble formado por dos cadenas complementarias o por una cadena única auto-complementaria. El ARN de interferencia habitualmente tiene identidad sustancial o completa con el gen diana. La secuencia del ARN de interferencia puede corresponder al gen diana de longitud completa, o a una sub-secuencia del mismo. El ARN de interferencia incluye “ARN de interferencia pequeño” o “siARN”, *es decir*, ARN de interferencia de aproximadamente 15-60, 15-50, 15-50, o 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, de forma más habitual aproximadamente, 15-30, 15-25 o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud, y es preferiblemente de aproximadamente 20-24 o aproximadamente 21-22 o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (*por ejemplo*, cada secuencia complementaria del siARN de doble cadena es de 15-60, 15-50, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 20-24 o aproximadamente 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud, y el siARN de doble cadena es de aproximadamente 15-60, 15-50, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 preferiblemente de aproximadamente 20-24 o aproximadamente 21-22 o 21-23 pares de base de longitud). Los siARN dúplex puede comprender extremos salientes 3’ terminales de aproximadamente 1 a 4 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 2 a 3 nucleótidos y fosfato 5’ terminal. El siARN puede sintetizarse químicamente o puede ser codificado por un plásmido (*por ejemplo*, transcribirse como secuencias que se pliegan automáticamente en forma de dúplex con bucles en horquilla). El siARN puede además generarse mediante el corte de ARNbc más grandes (*por ejemplo*, ARNbc mayor de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) con ARNasa III de E coli o Dícer. Estas enzimas procesan el ARNbc en forma de siARN biológicamente activo (*ver, por ejemplo*, Yang et al., PNAS USA 99: 9942-7 (2002); Calegari et al., PNAS USA 99: 14236 (2002); Byrom et al., Ambion TechNotes 10(1): 4-6 (2003); Kawasaki et al., Nucleic Acids Res. 31: 981-7 (2003); Knight y Bass, Science 293: 2269-71 (2001); y Robertson et al., J. Biol. Chem. 243: 82 (1968)).Preferiblemente, los ARNbc son de al menos 50 nucleótidos a aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos de longitud. Un ARNbc puede ser tan grande como 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos de longitud, o mayor. El ARNbc puede codificar un transcrito del gen total o un transcrito del gen parcial.

La expresión "identidad sustancial" hace referencia a una secuencia que hibrida con una secuencia de referencia bajo condiciones rigurosas, o a una secuencia que tiene un porcentaje de identidad específico sobre una región específica de una secuencia de referencia.

La frase “condiciones de hibridación rigurosas” hace referencia a las condiciones bajo las cuales una sonda hibridará con su sub-secuencia diana, habitualmente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero con ninguna otra secuencia. Las condiciones rigurosas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias de mayor longitud hibridan específicamente a temperaturas más elevadas. Una extensa guía a la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en la publicación de Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para estar aproximadamente 5-10°C por debajo del punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica con una fuerza iónica a un pH definido. El T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración nucleica definidos) en el cual el 50% de las sondas complementarias con la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (debido a que las secuencias diana están presentes en exceso, en el T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). Las condiciones rigurosas pueden también lograrse con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, se considera una señal positiva, al menos, dos veces la señal de fondo, preferiblemente 10 veces la señal de fondo de hibridación.

Ejemplos de las condiciones de hibridación rigurosas pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC, y SDS al 1%, incubando a 42°C, o, 5x SSC, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en 0,2x SSC, y SDS al 0,1% a 65°C. Para la PCR, es habitual una temperatura de aproximadamente 36ºC para una amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32ºC y 48ºC dependiendo de la longitud del cebador. Para una amplificación por PCR de rigurosidad elevada, es habitual una temperatura de aproximadamente 62ºC, aunque las temperatura de hibridación de alta rigurosidad pueden encontrarse en un rango de aproximadamente 50ºC hasta aproximadamente 65C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Las condiciones de ciclo habituales para amplificaciones tanto de baja como de alta rigurosidad incluyen una fase de desnaturalización de 90ºC – 95ºC durante 30 segundos - 2 min., una fase de hibridación de 30 segundos - 2 min. de duración, y una fase de extensión de aproximadamente 72ºC durante 1 - 2 minutos. Se proporcionan protocolos y directrices para reacciones de amplificación de alta y baja 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 bajo condiciones rigurosas siguen siendo sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la degeneración máxima permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos hibridan habitualmente bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. Ejemplos de “condiciones de hibridación moderadamente rigurosas” incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, 1 M de NaCl, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC at 45°C. Una hibridación positiva es de al menos dos veces la señal de fondo. Los expertos en el arte reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similares. Se proporcionan directrices adicionales para determinar parámetros de hibridación en numerosas referencias, *por ejemplo*, y en Current Protocols in Molecular Biology, de ed. Ausubel, *et al*.

Los términos “sustancialmente idéntico” o “identidad sustancial”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, hacen referencia a dos o más secuencias o sub-secuencias que son iguales o tienen un porcentaje específico de nucleótidos que son iguales (es decir, al menos aproximadamente un 60%, preferiblemente un 65%, 70%, 75%, preferiblemente 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad sobre una región específica), cuando se compara y alinea para determinar la correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o una región designada según se mide utilizando una de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Esta definición, cuando el contexto lo indica, también hace referencia de forma análoga al complemento de una secuencia. Preferiblemente, la identidad sustancial existe sobre una región que es al menos de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, o 100 nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, son la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y la de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la sub-secuencia, si fuera necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Pueden utilizarse parámetros por defecto del programa, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de la secuencia para las secuencias de ensayo en relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, tal como se utiliza en la presente patente, incluye la referencia a un segmento de cualquier número de las posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en desde 20 a 600, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200, de forma más habitual aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en las que una secuencia puede ser comparada con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias sean alineadas de manera óptima. Los métodos de alineamiento de secuencias se conocen bien en el arte. El alineamiento óptimo de secuencias para su comparación puede ser realizado, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat’l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (*see, e.g.*, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds. Suplemento de 1995)).

Un ejemplo preferido de algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402 (1977) y en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990), respectivamente. Se utilizan BLAST y BLAST 2.0, con los parámetros descritos en la presente patente, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos y proteínas de la invención. El software para realizar los análisis con BLAST se encuentra públicamente disponible a través del “National Center for Biotechnology Information” (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/). Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencia de alta puntuación (HSPs, por sus siglas en inglés) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que o bien coincide o satisface una puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T hace referencia al umbral de puntuación de palabras vecinas (Altschul *et al., supra*). Estas coincidencias iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar las búsquedas para encontrar HSPs de mayor longitud que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como pueda aumentarse la puntuación de alineamiento acumulada. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada cae a cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLAST (para las secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas. Pata secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (*ver* Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)) alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, M=5, N=-4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (*ver, por ejemplo*, Karlin & Altschul, Proc. Nat’l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad mínima de suma (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias de aminoácidos o nucleótidos pudiera ocurrir por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad mínima de suma 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 de mayor preferencia menor de aproximadamente 0,001.

La frase “inhibir la expresión de un gen diana” hace referencia a la habilidad de un siARN de la invención para iniciar el silenciamiento génico del gen diana. Para examinar el grado de silenciamiento génico, las muestras o ensayos del organismo de interés o de células en cultivo que expresan un constructo en particular se comparan con muestras de control que carecen de la expresión del constructo. A las muestras de control (que carecen de la expresión del constructo) se les asigna un valor relativo del 100%. La inhibición de la expresión de un gen diana se logra cuando el valor del ensayo en relación al control es de aproximadamente un 90%, preferiblemente un 50%, más preferiblemente 25-0%. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, el análisis de los niveles de proteína o ARNm utilizando técnicas conocidas para los expertos en el arte tales como ensayos dot blot, northern blot, hibridación in situ, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, además de ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en el arte.

El término “ácido nucleico” hace referencia a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma de cadena única o doble. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos o enlaces de estructura principal modificada, que son sintéticos, naturales, y no naturales, que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil fosfonatos, metil fosfonatos quirales, ribonucleótidos 2’-O-metilo, ácidos péptidonucleicos (APN).

Por “silenciamiento” o “regulación por disminución” de un gen o ácido nucleico ha de entenderse una disminución detectable de la traducción de una secuencia de ácido nucleico diana, *es decir*, la secuencia fijada como diana por el ARNi, o una disminución en la cantidad o actividad de la secuencia o proteína diana, en comparación con el nivel que se detecta en ausencia de ARN de interferencia o de otra secuencia de ácido nucleico. Una disminución detectable puede ser tan pequeña como aproximadamente un 5% o 10%, o tan grande como aproximadamente un 80%, 90% o 100%. De forma más habitual, una disminución detectable es de aproximadamente un 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, o 70%.

Una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una “cantidad efectiva” de un siARN es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, *por ejemplo*, una disminución en la expresión de una secuencia diana en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia de siARN.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término “solución acuosa” hace referencia a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, agua.

Tal como se utiliza en la presente patente, el término “solución lipídica orgánica” hace referencia a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, un disolvente que posee un lípido.

"Sitio distal", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un sitio físicamente separado, que no está limitado a un lecho capilar adyacente, sino que incluye sitios ampliamente distribuidos a lo largo de un organismo. En algunos modos de realización, sitio distal hace referencia a un sitio físicamente separado del sitio de la enfermedad (*por ejemplo*, el sitio de un tumor, el sitio de una inflamación, o el sitio de una infección).

"Estable en suero" en relación a partículas de ácido nucleico-lípido significa que la partícula no se degrada de forma significativa después de la exposición a un ensayo con suero o una nucleasa que degradaría significativamente el ADN libre. Ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo en suero estándar o un ensayo de ADNasa tal como los descritos en los Ejemplos más adelante.

"Administración sistémica", tal como se utiliza en la presente patente, hace referencia a un sistema de administración que conduce a una biodistribución amplia de un compuesto dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir a la administración sistémica de determinados compuestos, pero no otros. Administración sistémica significa que una cantidad útil, preferiblemente terapéutica, de un compuesto es expuesta a la mayoría de las partes del organismo. Para obtener una amplia biodistribución generalmente se requiere de un tiempo de vida en sangre tal que el compuesto no se degrade o se elimine rápidamente (tal como por ejemplo, por parte de órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o por una unión celular no específica y rápida), antes de alcanzar un sitio con la enfermedad distal con respecto al sitio de administración. La administración sistémica de partículas de ácido nucleico-lípido puede ser mediante cualquier medio conocido en el arte incluyendo, por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, intraperitoneal. En un modo de realización preferido, la administración sistémica de partículas de ácido nucleico-lípido se realiza mediante administración por vía intravenosa.

"Administración local", tal como se utiliza en la presente patente hace referencia a la administración de un compuesto directamente a un sitio diana dentro de un organismo. Por ejemplo, un compuesto puede administrarse

localmente mediante inyección directa en un sitio con la 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, y similares.

III. Partículas estables de ácido nucleico-lípido

Las partículas estables de ácido nucleico-lípido (SNALP) descritas en la presente patente comprenden un siARN, un lípido catiónico, un lípido no catiónico y un componente estabilizador bicapa que es un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido que inhibe la agregación de las SNALP. Las SNALP tiene un diámetro medio de menos de aproximadamente 150 nm y son sustancialmente no tóxico. Además, los ácidos nucleicos encapsulados en las SNALP son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa.

A. Lípidos catiónicos

Pueden utilizarse diversos lípidos catiónicos adecuados en la presente patente, ya sea solos o en combinación con una o más especies de lípidos catiónicos o especies de lípidos neutros diferentes.

Los lípidos catiónicos que son de utilidad en la presente invención pueden ser cualquiera de entre una serie de especies de lípidos que portan una carga neta positiva en pH fisiológico, por ejemplo: DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DOSPA, DOGS, DC-Chol y DMRIE, o combinaciones de los mismos. Una serie de estos lípidos y análogos relacionados, que son también de utilidad en la presente invención, han sido descritos en las patentes estadounidenses Nos. 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833, 5.283.185, 5.753.613 y 5.785.992.

El lípido catiónico comprende habitualmente de aproximadamente un 2% hasta aproximadamente un 60% del lípido total presente en dicha partícula, preferiblemente desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 45% del lípido total presente en dicha partícula. En determinados modos de realización preferidos, el lípido catiónico comprende desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 15% del lípido total en dicha partícula. En otros modos de realización, el lípido catiónico comprende desde aproximadamente un 40% hasta aproximadamente un 50% del lípido total en dicha partícula. Dependiendo del uso deseado de las partículas de ácido nucleico-lípido, las proporciones de los componentes son variadas y la eficacia de la administración de una formulación en particular puede medirse utilizando un ensayo de parámetros de liberación endosomal (ERP, por sus siglas en inglés). Por ejemplo, para la administración sistémica, el lípido catiónico puede comprender desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 15% del lípido total presente en dicha partícula, y para la administración local o regional, el lípido catiónico comprende desde aproximadamente un 40% hasta aproximadamente un 50% del lípido total presente en dicha partícula.

B. Lípidos no catiónicos

El componente lípido no catiónico de las SNALP descrito en la presente patente puede ser cualquiera de una variedad de lípidos zwitteriónicos neutros no cargados o aniónicos capaces de producir un complejo estable. Son preferiblemente neutros, aunque pueden tener, de manera alternativa, carga positiva o negativa. Ejemplos de lípidos no catiónicos útiles en la presente invención incluyen: materiales relacionados con fosfolípidos, tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), palmitoiloleilfosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE) y 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE-mal). Pueden estar presentes lípidos o esteroles no catiónicos tales como colesterol. Lípidos adicionales que no contienen fósforo son, *por ejemplo*, estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, acetil palmitato, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfotéricos, laurilsulfato de trietanolamina, alquil-aril-sulfato-amidas de ácidos grasos polietoxilados, bromuro de dioctadecildimetil ammonio y similares, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, y cerebrósidos. Pueden estar presentes otros lípidos tales como lisofosfatidilcolina y lisofosfatidiletanolamina. Entre los lípidos no catiónicos también se incluyen polímeros a base de polietilenglicol tales como PEG 2000, PEG 5000 y polietilenglicol conjugado con fosfolípidos o con ceramidas (denominados PEG-Cer), según se describe en la Patente estadounidense Nº 5.820.873.

En modos de realización preferidos, los lípidos no catiónicos son diacilfosfatidilcolina (por ejemplo, diestearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina y dilinoleoilfosfatidilcolina), diacilfosfatidiletanolamina (*por ejemplo*, dioleoilfosfatidiletanolamina y palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina), ceramida o esfingomielina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferiblemente grupos acilo obtenidos a partir de ácidos grasos con cadenas de carbono C_{10}-C_{24}. Más preferiblemente, los grupos acilo son lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo o oleoilo. En modos de realización particularmente preferidos, el lípido no catiónico incluirá uno o más de colesterol, 1,2-sn-dioleoilfosfatidiletanolamina, o esfingomielina de huevo (ESM).

El lípido no catiónico comprende habitualmente desde aproximadamente un 5% hasta aproximadamente un 90% del lípido total en dicha partícula, preferiblemente desde aproximadamente un 20% hasta aproximadamente un 85% del lípido total en dicha partícula. El conjugado de PEG-DAG habitualmente comprende desde un 1% hasta aproximadamente un 20% del lípido total presente en dicha partícula, preferiblemente desde un 4% hasta aproximadamente un 15% del lípido total presente en dicha partícula. Las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención pueden además comprender colesterol. Si está presente, el colesterol comprende habitualmente desde un 10% hasta aproximadamente un 60% del lípido total presente en dicha partícula, preferiblemente el colesterol comprende desde aproximadamente un 20% hasta aproximadamente un 45% del lípido total presente en dicha partícula.

C. Componente de estabilización de la bicapa

La SNALP descrita en la presente invención puede además comprender un componente de estabilización de la bicapa (BSC, por sus siglas en inglés). Los BSC adecuados incluyen, pero no se limitan a, oligómeros de poliamida, péptidos, proteínas, detergentes, derivados lipídicos, PEG-lípidos, tales como PEG acoplado a dialquiloxipropilos (PEG-DAA), PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG), PEG acoplado a fosfatidiletanolamina (PE) (PEG-PE), o PEG conjugado a ceramidas, o una mezcla de los mismos (ver, Patente estadounidense Nº 5.885.613). El componente de estabilización de la bicapa puede ser un PEG-lípido, o un ATTA-lípido. El BSC puede ser un lípido conjugado que inhibe la agregación de las SNALP. Lípidos conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, conjugados de PEG-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados polímero catiónico-lípido (CPL, por sus siglas en inglés) o mezclas de los mismos. Las SNALP descritas en la presente patente comprenden un conjugado de PEG-lípido o bien un conjugado de ATTA-lípido, junto con un CPL. La partícula de ácido nucleico-lípido para su uso según la invención comprende un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido.

Habitualmente, el componente de estabilización de la bicapa está presente en un rango desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 50% del lípido total presente en la partícula. En un modo de realización preferido, el componente de estabilización de la bicapa está presente desde aproximadamente un 0,5% hasta aproximadamente un 25% del lípido total en la partícula. En otros modos de realización preferidos, el componente de estabilización de la bicapa está presente desde aproximadamente un 1% hasta aproximadamente un 20%, o aproximadamente un 3% hasta aproximadamente un 15% o aproximadamente un 4% hasta aproximadamente un 10% del lípido total en la partícula. Un experto en la práctica habitual del arte apreciará que la concentración del componente de estabilización de la bicapa puede ser variada dependiendo del componente de estabilización de la bicapa empleado y la tasa a la que el liposoma se vuelve fusogénico.

Controlando la composición y la concentración del componente de estabilización de la bicapa, se puede controlar la tasa a la que el componente de estabilización de la bicapa se intercambia hacia el exterior del liposoma y, a su vez, la tasa a la cual el liposoma se vuelve fusogénico. Por ejemplo, cuando un conjugado de polietilenglicol-fosfatidiletanolamina o un conjugado polietilenglicol-ceramida se utiliza como el componente de estabilización de la bicapa, la tasa a la que el liposoma se vuelve fusogénico puede ser variada, por ejemplo, variando la concentración del componente de estabilización de la bicapa, variando el peso molecular del polietilenglicol, o variando la longitud de la cadena y el grado de saturación de los grupos de la cadena acilo en la fosfatidiletanolamina o la ceramida. Además, otras variables incluyendo, por ejemplo, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. pueden ser utilizadas para variar y/o controlar la tasa a la que el liposoma se vuelve fusogénico. Otros métodos que pueden ser utilizados para controlar la tasa a la que el liposoma se vuelve fusogénico serán obvios para los expertos en el arte al leer la presente revelación.

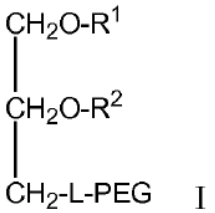
1. Conjugados de diacilglicerol-polietilenglicol

El componente de estabilización de la bicapa descrito en la presente patente puede ser un conjugado de diacilglicerol-polietilenglicol, *es decir*, un conjugado DAG-PEG o un conjugado PEG-DAG. En un modo de realización preferido, el conjugado de DAG-PEG es un conjugado de dilaurilglicerol (C_{12})-PEG, un conjugado de dimiristilglicerol (C_{14})-PEG (DMG), un conjugado de dipalmitoilglicerol (C_{16})-PEG o un conjugado de diestearilglicerol (C_{18})-PEG (DSG). Los expertos en el arte apreciarán fácilmente que pueden ser utilizados otros diacilgliceroles en los conjugados DAG-PEG de la presente invención. Los conjugados de DAG-PEG adecuados para su uso en la presente invención, y métodos para su elaboración y utilización, se revelan en la Solicitud estadounidense Nº 10/136.707 publicada como U.S.P.A. 2003/0077829, y solicitud de Patente PCT Nº CA 02/00669.

2. Conjugados dialquiloxipropilo

El componente de estabilización de la bicapa descrito en la presente patente puede comprender un conjugado de dialquiloxipropilo, *es decir*, un conjugado de PEGDAA. En un modo de realización preferido, el conjugado de PEG-DAA presenta la siguiente fórmula:

En la Fórmula I, R^1 y R^2 se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tienen desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 22 átomos de carbono. Los grupos alquilo de cadena larga puede ser saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, laurilo (C_{12}), miristilo (C_{14}), palmitilo (C_{16}), estearilo (C_{18}) e icosilo (C_{20}). En modos de realización preferidos, 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 I, PEG es un polietilenglicol que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 550 a aproximadamente 8.500 daltons. En un modo de realización preferido, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 daltons, más preferiblemente, de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 3.000 daltons y, más preferiblemente incluso, de aproximadamente 2.000 daltons. El PEG puede ser opcionalmente sustituido por un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En la Fórmula I, L es una fracción conectora. Puede utilizarse cualquier fracción conectora adecuada para acoplar el PEG a la cadena principal del dialquiloxipropilo. Las fracciones conectoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonilo (-C(O)-), carbonato (O-C(O)O-), carbamato (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), succinilo (-(O)CCH_2CH_2C(O)-), éter, disulfuro, y combinaciones de los mismos. Se conocen bien en el arte otros conectores adecuados.



I

Pueden conjugarse fosfatidiletanolaminas que tienen una variedad de grupos de cadena acilo de diversas longitudes de cadena y grados de saturación, con polietilenglicol para formar el componente de estabilización de la bicapa. Tales fosfatidiletanolaminas se encuentran disponibles comercialmente, o pueden ser aisladas o sintetizadas utilizando técnicas convencionales conocidas para los expertos en el arte. Se prefieren las fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadena de carbono en un rango de C_{10} a C_{20}. También se pueden utilizar fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono- o di-insaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, pero sin limitarse a, las siguientes: dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE).

Al igual que con las fosfatidiletanolaminas, las ceramidas que tienen una variedad de grupos de cadena acilo de diversas longitudes de cadena y grados de saturación, pueden acoplarse con polietilenglicol para formar el componente de estabilización de la bicapa. Resultará evidente para los expertos en el arte que, en contraste con las fosfatidiletanolaminas, las ceramidas presentan únicamente un grupo acilo que puede ser variado fácilmente en términos de su longitud de cadena y grado de saturación. Las ceramidas para su uso de acuerdo con la presente invención se encuentran disponibles comercialmente. Además, las ceramidas pueden aislarse, por ejemplo, del huevo o cerebro utilizando técnicas de aislamiento bien conocidos o, alternativamente, pueden sintetizarse utilizando los métodos y técnicas revelados en la Patente estadounidense Nº 5.820.873. Utilizando las vías sintéticas expuestas en la anterior solicitud, pueden prepararse ceramidas que tienen ácidos grasos saturados e insaturados con longitudes de la cadena de carbono en el rango de C_2 a C_{31}.

3. Lípidos poliméricos catiónicos

Pueden también utilizarse lípidos poliméricos catiónicos (CPL) en las SNALP descritas en la presente patente. Los CPL adecuados presentan habitualmente las siguientes características arquitectónicas: (1) un anclaje lipídico, tal como un lípido hidrófobo, para incorporar los CPL en la bicapa lipídica; (2) un espaciador hidrófilo, tal como un polietilenglicol, para enlazar el anclaje lipídico a un grupo de cabeza catiónico; y (3) una fracción policatiónica, tal como un aminoácido de origen natural, para producir un grupo de cabeza catiónico protonizable. Se revelan SNALP y SNALP-CPL adecuadas, y métodos para elaborar y utilizar SNALP y SNALP-CPL, *por ejemplo*, en las solicitudes estadounidenses Nos. 09/553.639 y 09/839.707 (publicada como U.S.P.A. 2002/0072121) y la solicitud de Patente PCT Nº CA 00/00451 (publicada como WO 00/62813).

Brevemente, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula II:

A-W-Y I

en donde A, W e Y son tal y como sigue a continuación.

En referencia a la Fórmula II, "A" es una fracción lipídica tal como un lípido anfipático, un lípido neutro o un lípido hidrófobo que actúa como un anclaje lipídico. Ejemplos de lípidos adecuados incluyen lípidos formadores de

vesículas o lípidos que adoptan la forma de vesícula e incluyen, pero no se limitan a, diacilgliceroles, dialquilgliceroles, 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. De manera alternativa, el polímero hidrófilo puede ser débilmente antigénico si se utiliza con adyuvantes adecuados. Los polímeros no inmunogénicos incluyen, pero no se limitan a, PEG, poliamidas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico y combinaciones de los mismos. En un modo de realización preferido, el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 250 hasta aproximadamente 7000 daltons.

"Y" es una fracción policatiónica. El término fracción policatiónica hace referencia 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. Las fracciones policatiónicas adecuadas incluyen aminoácidos básicos y sus derivados tales como arginina, asparagina, glutamina, lisina e histidina; espermina; espermidina; dendrímeros catiónicos; poliaminas; poliamino-azúcares; y amino polisacáridos. Las fracciones policatiónicas pueden ser lineales, tales como la tetralisina lineal, de estructura ramificada o dendrimérica. Las fracciones policatiónicas presentan 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 en valores de pH seleccionados. La selección de la fracción policatiónica que se va a emplear, puede determinarse mediante el tipo de aplicación del liposoma que se desea.

Las cargas en las fracciones policatiónicas pueden estar o bien distribuidas alrededor de toda la fracción de liposoma, o de manera alternativa, pueden presentarse en una concentración de densidad de carga discreta en un área en particular de la fracción de liposoma, *por ejemplo*, en un pico de carga. Si la densidad de carga se distribuye sobre el liposoma, la densidad de carga puede distribuirse equitativamente o distribuirse no equitativamente. Todas las variaciones de la distribución de la carga de la fracción policatiónica son abarcadas por la presente invención.

El lípido "A," y el polímero no inmunogénico "W," pueden enlazarse mediante diversos métodos y preferiblemente, por enlace covalente. Pueden utilizarse métodos conocidos para los expertos en el arte, para el enlace covalente de "A" y "W". Entre los enlaces adecuados se incluyen, pero sin limitarse a, enlaces amida, amina, carboxilo, carbonato, carbamato, éster e hidrazona. Resultará obvio para los expertos en el arte 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 terminal hidroxilo se activa, por ejemplo con NHS y DCC, para formar un éster activo, y a continuación se hace reaccionar con un polímero que contiene un grupo amino, tal como con una poliamida (ver, Patentes estadounidenses Nos. 6.320.017 y 6.586.559), un enlace amida se formará entre los dos grupos.

En ciertos ejemplos, la fracción policatiónica puede tener un ligando unido, tal como un ligando para la fijación de la diana o una fracción quelante para formar complejo con el calcio. Preferiblemente, después de que se enlaza el ligando, la fracción catiónica mantiene una carga positiva. En determinados casos, el ligando que está unido tiene una carga positiva. Ligandos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluyen lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos portadores, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos analíticamente detectables, compuestos terapéuticamente activos, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, estimuladores inmunes, radiomarcadores, fluorógenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otras fracciones para la fijación de las dianas o toxinas.

D. siARN

El componente de ácido nucleico de las SNALP comprende un siARN.

1. Genes diana

Generalmente, se desea administrar las SNALP para regular por disminución o silenciar la traducción (*es decir*, la expresión) de un producto génico de interés. Los tipos de producto génico adecuados incluyen, pero no se limitan a, genes asociados a infección vírica y a la supervivencia viral, genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (*por ejemplo*, enfermedades y trastornos en los que el hígado es la diana, y las enfermedades y trastornos hepáticos), y trastornos, genes asociados con la tumorigénesis y la transformación celular, genes angiogénicos, genes inmunomoduladores, tales como los asociados con respuestas inflamatorias y autoinmunes, genes receptores de ligandos, y genes asociados con trastornos neurodegenerativos.

Los genes asociados con una infección vírica y la supervivencia viral incluyen aquellos expresados por un virus para unirse, introducirse y replicarse en una célula. De particular interés son las secuencias víricas asociadas con enfermedades víricas crónicas. Las secuencias víricas de particular interés incluyen secuencias de virus de la

Hepatitis (Hamasaki, et al., FEBS Lett. 543:51 (2003); Yokota, et al., EMBO Rep. 4:602 (2003); Schlomai, et al., Hepatology 37:764 (2003); Wilson, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2783 (2003); Kapadia, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100:2014 (2003); y FIELDS VIROLOGY (Knipe et al. eds. 2001)), Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Banerjea, et al., Mol. Ther. 8:62 (2003); Song, et al., J. Virol, 77:7174 (2003); Stephenson JAMA 289:1494 (2003); Qin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 100:183 (2003)), virus del Herpes (Jia, et al., J. Virol. 77:3301 (2003)), y virus del papiloma humano (VPH) (Hall, et al., J. Virol. 77:6066 (2003); Jiang, et al., Oncogene 21:6041 (2002)). Los ejemplos de secuencias de ácido nucleico vírico de la hepatitis que pueden ser silenciadas incluyen, pero no se limitan a: secuencias de ácido nucleico implicadas en la transcripción y traducción (*por ejemplo*, En1, En2, X, P), secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (*por ejemplo*, proteínas del núcleo que incluyen proteínas C y proteínas relacionadas con la proteína C; proteínas cápside y proteínas de envoltura que incluyen proteínas S, M, y/o L, o fragmentos de las mismas) (*ver, por ejemplo*, FIELDS VIROLOGY, 2001, *supra*). Ejemplos de secuencias de ácido nucleico de Hepatitis C que pueden ser silenciadas incluyen, pero no se limitan a: proteasas de serina (*por ejemplo*, NS3/NS4), helicasas (*por ejemplo*, NS3), polimerasas (*por ejemplo*, NS5B), y proteínas de envoltura (*por ejemplo*, E1, E2, y p7). Secuencias de ácido nucleico de Hepatitis A se exponen en, *por ejemplo*, el Nº de acceso del Genbank NC_001489 ; secuencias de ácido nucleico de Hepatitis B se exponen en, *por ejemplo*, el Nº de acceso del Genbank NC_003977; secuencias de ácido nucleico de Hepatitis C se exponen en, *por ejemplo*, el Nº de acceso del Genbank NC_004102; secuencias de ácido nucleico de Hepatitis D se exponen en, *por ejemplo*, el Nº de acceso del Genbank NC_001653; secuencias de ácido nucleico de Hepatitis E se exponen en, *por ejemplo*, el Nº de acceso del Genbank NC_001434; y secuencias de ácido nucleico de Hepatitis G se exponen en, *por ejemplo*, el Nº de acceso del Genbank NC_001710. El silenciamiento de secuencias que codifica genes asociados con una infección vírica y la supervivencia viral puede ser utilizado de forma conveniente en combinación con la administración de agentes convencionales utilizados para tratar la condición vírica.

Los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (*por ejemplo*, trastornos en los que el hígado es la diana, y enfermedades y trastornos del hígado), incluyen, por ejemplo, genes expresados en, por ejemplo, dislipidemia (por ejemplo, receptores X hepáticos (*por ejemplo*, LXRα y LXRβ Nº de acceso del Genback NM_007121), receptores farnesoide X (FXR, por sus siglas en inglés) (Nº de Acceso del Genbank NM_005123), proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP), proteasa de sitio 1 (S1P), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A reductasa (HMG coenzima-A reductasa), Apolipoproteína (ApoB), y Apolipoproteína (ApoE)) y diabetes (*por ejemplo*, Glucosa 6-fosfatasa) (*ver, por ejemplo*, Forman et al., Cell 81:687 (1995); Seol et al., Mol. Endocrinol. 9:72 (1995), Zavacki et al., PNAS USA 94:7909 (1997); Sakai, et al., Cell 85:1037-1046 (1996); Duncan, et al., J. Biol. Chem. 272:12778-12785 (1997);, Willy, et al., Genes Dev. 9(9):1033-45 (1995); Lehmann, et al., J. Biol. Chem. 272(6):3137-3140 (1997); Janowski, et al., Nature 383:728-731 (1996); Peet, et al., Cell 93:693-704 (1998)). Un experto en el arte apreciará que los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (*por ejemplo*, enfermedades y trastornos en los que el hígado es una diana, y enfermedades y trastornos del hígado), incluyen genes que se expresan en el propio hígado además de genes expresados en otros órganos y tejidos. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos, puede utilizarse, de forma conveniente, en combinación con la administración de agentes convencionales utilizados para tratar la enfermedad o trastorno.

Ejemplos de secuencias de genes asociadas a la tumorigénesis y a la transformación celular incluyen secuencias de translocación tales como genes de fusión MLL, BCR-ABL (Wilda, et al., Oncogene, 21:5716 (2002); Scherr, et al., Blood 101:1566), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO y AML1-MTG8 (Heidenreich, et al., Blood 101:3157 (2003)); secuencias sobre-expresadas tales como genes con resistencia a múltiples fármacos (Nieth, et al., FEBS Lett. 545:144 (2003); Wu, et al, Cancer Res. 63:1515 (2003)), ciclinas (Li, et al., Cancer Res. 63:3593 (2003); Zou, et al., Genes Dev. 16:2923 (2002)), beta-Catenina (Verma, et al., Clin Cancer Res. 9:1291 (2003)), genes de telomerasa (Kosciolek, et al., Mol Cancer Ther. 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, ERBB1 y ERBB2 (Nagy, et al. Exp. Cell Res. 285:39 (2003)); y secuencias mutadas tales como RAS (revisadas en Tuschl y Borkhardt, Mol. Interventions, 2:158 (2002)). El silenciamiento de secuencias que codifican enzimas de reparación de ADN encuentran una aplicación en combinación con la administración de agentes quimioterapéuticos (Collis, et al., Cancer Res. 63:1550 (2003)). Los genes que codifican proteínas asociadas con la migración de tumores son también secuencias diana de interés, por ejemplo, integrinas, selectinas y metaloproteinasas. Los anteriores ejemplos no son exclusivos. Cualquier secuencia de genes parcial o completa que facilite o promueva la tumorigénesis o transformación celular, crecimiento tumoral o migración tumoral, puede ser incluida como secuencia modelo.

Los genes angiogénicos son capaces de promover la formación de nuevos vasos. De particular interés es el Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Reich, et al., Mol. Vis. 9:210 (2003)).

Los genes inmunomoduladores son genes que modulan una o más respuestas inmunes. Ejemplos de genes inmunomoduladores genes incluyen citoquinas tales como los factores de crecimiento (*por ejemplo*, TGF-α., TGF-β, EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GMCSF, SCF, etc.), interleucinas (*por ejemplo*, IL-2, IL-4, IL-12 (Hill, et al., J. Immunol. 171:691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20, etc.), interferones (*por ejemplo*, IFN-α, IFN-β, IFN-γ, etc.) y TNF. Los genes de Fas y del ligando Fas son también secuencias diana de interés inmunomoduladoras (Song, et al., Nat. Med. 9:347 (2003)). Los genes que codifican moléculas de señalización secundaria en células hematopoyéticas y

linfoides se incluyen también en la presente invención, por ejemplo, la familia de las Tec-quinasas, tales como la tirosina quinasa de Bruton (Btk) (Heinonen, et al., FEBS Lett. 527:274 (2002)).

Los ligandos receptores de células incluyen ligandos que son capaces de unirse a los receptores de la superficie celular (*por ejemplo*, receptor de la insulina, receptor EPO, receptores acoplados a la proteína G, receptores con actividad tirosina quinasa, receptores de citoquinas, receptores del factor de crecimiento, etc.), para modular (por ejemplo, inhibir, activar, etc.) la vía fisiológica en la que el receptor está implicado (*por ejemplo*, modulación del nivel de glucosa, desarrollo de las células sanguíneas, mitogénesis, etc.). Ejemplos de ligandos receptores de célula incluyen citoquinas, factores de crecimiento, interleucinas, interferones, eritropoyetina (EPO), insulina, glucagón, ligandos de receptores acoplados a la proteína G, etc.). Los modelos que codifican una expansión de repeticiones de trinucleótidos (*por ejemplo*, repeticiones de CAG), son de utilidad en el silenciamiento de secuencias patogénicas en trastornos neurodegenerativos causados por la expansión de repeticiones de trigonucleótidos, tales como la atrofia muscular espinobulbar y la enfermedad de Huntington (Caplen, et al., Hum. Mol. Genet. 11:175 (2002)).

IV. Preparación de las SNALP

También se describen en la presente patente métodos para preparar las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero, de tal manera que el ácido nucleico, que es un siARN, se encapsule en una bicapa lipídica y se proteja de la degradación. Las SNALP realizadas mediante dichos métodos son habitualmente de aproximadamente 50 a 150 nm de diámetro. Generalmente, estas partículas tienen un diámetro medio de menos de 150 nm, más habitualmente un diámetro de menos de aproximadamente 100 nm, con una mayoría de las partículas con un diámetro de aproximadamente 65 a 85 nm. Las partículas pueden formarse utilizando cualquier método conocido en el arte incluyendo, por ejemplo, un método de diálisis con detergente o mediante modificación de un método de fase reversa que utiliza disolventes orgánicos para proporcionar una fase única durante el mezclado de los componentes. Sin la intención de estar sujetos a ningún mecanismo de formación en particular, un plásmido u otro ácido nucleico (es decir, siARN) se hace contactar con una solución detergente de lípidos catiónicos para formar un complejo de ácidos nucleicos recubiertos. Estos ácidos nucleicos recubiertos pueden agregarse y precipitarse. Sin embargo, la presencia de un detergente reduce esta agregación y permite que los ácidos nucleicos recubiertos reaccionen con el exceso de lípidos (habitualmente, lípidos no catiónicos) para formar partículas en las que el plásmido u otro ácido nucleico está encapsulado en una bicapa lipídica. Los métodos descritos a continuación para la formación de partículas de ácido nucleico-lípido que utilizan disolventes orgánicos siguen un esquema similar. Ejemplos de métodos de elaboración de SNALP se revelan en las patentes estadounidenses Nos. 5.705.385; 5.981.501; 5.976.567; 6.586.410; 6.534.484; solicitud de patente estadounidense Nº 09/553.639; U.S.P.A. Publicación Nos. 2002/0072121 y 2003/0077829) WO 96/40964; y WO 00/62813.

En un modo de realización, se describen en la presente patente partículas de ácido nucleico-lípido producidas a través de un proceso que incluye proporcionar una solución acuosa en un primer depósito, y proporcionar una solución de lípidos orgánicos en un segundo depósito, y mezclar la solución acuosa con la solución de lípidos orgánicos, de tal manera que la solución de lípidos orgánicos se mezcle con la solución acuosa para producir de forma sustancialmente instantánea un liposoma que encapsule el ácido nucleico. Este proceso y el aparato para realizar este proceso se describe en detalle en la Solicitud de Patente estadounidense Nº 10/611, 274 presentada el 30 de junio de 2003.

La acción de introducir continuamente soluciones de lípidos y soluciones tampón en un entorno de mezclado, tal como por ejemplo una cámara de mezclado, causa una dilución continua de la solución de lípidos con la solución tampón, produciendo de ese modo un liposoma de forma sustancialmente instantánea después del mezclado. Tal como se utiliza en la presente patente, la frase “diluir de forma continua una solución de lípidos con una solución tampón” (y sus variaciones) generalmente significa que la solución de lípidos se diluye de forma suficientemente rápida en un proceso de hidratación con la suficiente fuerza para efectuar la generación de vesículas. Al mezclar la solución acuosa con la solución de lípidos orgánicos, la solución de lípidos orgánicos sufre una dilución continua en etapas en presencia de la solución tampón (acuoso) para producir un liposoma.

En algunos modos de realización, las partículas se forman utilizando diálisis con detergente. Por tanto, se describe en la presente patente un método para la preparación de partículas de ácido nucleico-lípido, que comprende:

(a) combinar un ácido nucleico con lípidos catiónicos en una solución detergente para formar un complejo de ácido nucleico-lípido recubierto;

(b) poner en contacto lípidos no catiónicos con el complejo de ácido nucleico-lípido recubierto para formar una solución detergente que comprenda un complejo de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos; y

c) dializar la solución detergente de la etapa (b) para proporcionar una solución de partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero, en donde el ácido nucleico se encapsula en una bicapa lipídica y las partículas son estables en suero y tienen un tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm.

Se forma una solución inicial de complejos de ácido nucleico-lípido recubiertos combinando el ácido nucleico con los lípidos catiónicos en una solución detergente.

En estos modos de realización, la solución detergente es preferiblemente una solución de un detergente neutro con una concentración crítica de micelas de 15-300 mM, más preferiblemente de 20-50 mM. Ejemplos de detergentes adecuados incluyen, por ejemplo, N,N'-((octanoilimino)-bis-(trimetileno))-bis-(D-gluconamida) (BIGCHAP); BRIJ 35; Desoxi-BIGCHAP; polietilenglicol dodecil 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-glucopiranósido; y heptil-tio-glucopiranósido; siendo octil β-D-glucopiranósido y Tween-20 los de mayor preferencia. La concentración de detergente en la solución detergente es habitualmente de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 2 M, preferiblemente de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 1,5 M.

Los lípidos catiónicos y los ácidos nucleicos se combinarán habitualmente para producir una relación de la carga (+/-) de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 20:1, preferiblemente en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 12:1, y más preferiblemente en una relación de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 6:1. Adicionalmente, la concentración total de ácido nucleico en solución será generalmente de aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 1 mg/mL, preferiblemente de aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, y más preferiblemente de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL. La combinación de ácidos nucleicos y lípidos catiónicos en solución detergente se mantiene, habitualmente a temperatura ambiente, durante un periodo de tiempo que sea suficiente para que se formen los complejos recubiertos. De manera alternativa, los ácidos nucleicos y los lípidos catiónicos pueden combinarse en la solución detergente y calentarse a temperaturas de hasta aproximadamente 37°C. Para los ácidos nucleicos que son particularmente sensibles a la temperatura, los complejos recubiertos pueden formarse a temperaturas más bajas, habitualmente hasta aproximadamente 4°C.

En un modo de realización preferido, las relaciones de ácido nucleico con respecto a los lípidos (relaciones de masa/masa) en una SNALP formada estarán en un rango de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08. La relación de materiales de partida también se encuentra dentro de este rango ya que la etapa purificación habitualmente elimina el ácido nucleico encapsulado además de los liposomas vacíos. En otro modo de realización preferido, la preparación de la SNALP utiliza aproximadamente 400 µg de ácido nucleico por 10 mg de lípido total o una relación de ácido nucleico con respecto a lípidos de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08 y, más preferiblemente, aproximadamente 0,04, lo que corresponde a 1,25 mg de lípidos totales por 50 µg de ácido nucleico.

La solución detergente de los complejos de ácido nucleico-lípido se pone en contacto entonces con lípidos no catiónicos para proporcionar una solución detergente de complejos de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos. Los lípidos no catiónico que son útiles en esta etapa incluyen, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, cardiolipina, y cerebrósidos. En modos de realización preferidos, los lípidos no catiónicos son diacilfosfatidilcolinea, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida o esfingomielina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferiblemente grupos acilo obtenidos a partir de ácidos grasos que tienen cadenas de carbono C_{10}-C_{24}. Más preferiblemente los grupos acilo son lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo u oleoilo. En modos de realización particularmente preferidos, el lípido no catiónico será 1,2-sn-dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoil oleoil fosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, o una mezcla de los mismos. En los modos de realización de mayor preferencia, las partículas de ácido nucleico-lípido serán partículas fusogénicas con propiedades mejoradas *in vivo* y el lípido no catiónico será DSPC o DOPE. Además, las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención pueden además comprender colesterol. En otros modos de realización preferidos, los lípidos no catiónicos comprenderán además polímeros a base de polietilenglicol tales como PEG 2000, PEG 5000 y polietilenglicol conjugado con un diacilglicerol, una ceramida o un fosfolípido, tal como se describe en la Patente estadunidense Nº 5.820.873 y en la Solicitud de Patente en tramitación junto con la presente Nº 10/136.707 (publicada como U.S.P.A. Nº de publicación 2003/0077829. En modos de realización preferidos adicionales, los lípidos no catiónicos comprenderán además polímeros a base de polietilenglicol tales como PEG 2000, PEG 5000 y polietilenglicol conjugado con un dialquiloxipropilo.

La cantidad de lípido no catiónico que se utiliza en los presentes métodos es habitualmente de 2 a aproximadamente 20 mg de lípidos totales hasta 50 µg de ácido nucleico. Preferiblemente, la cantidad de lípidos totales es de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg per 50 µg de ácido nucleico.

A continuación de la formación de la solución detergente de complejos de ácido nucleico-lípido y lípidos no catiónicos, se retira el detergente, preferiblemente mediante diálisis. La retirada del detergente tiene como resultado la formación de una bicapa lipídica que rodea el ácido nucleico, lo que proporciona partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero que tienen un tamaño desde aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm. Las partículas formadas de este modo no se agregan y se dimensionan opcionalmente para lograr un tamaño de partícula uniforme.

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero pueden ser dimensionadas mediante cualquiera de los métodos disponibles para el dimensionamiento del tamaño de los liposomas. El dimensionamiento puede realizarse para lograr un rango de tamaño deseado y una distribución relativamente acotada de los tamaños de las partículas.

Se encuentran disponibles diversas técnicas para dimensionar las partículas en un tamaño deseado. Un método de dimensionamiento, utilizado para los liposomas e igualmente aplicable a las presentes partículas se describe en la patente estadounidense Nº 4.737.323. La sonicación de una suspensión de partículas, ya sea por sonicación en baño o con sonda, produce una reducción de tamaño progresiva hasta partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La homogeneización es otro método que se basa en energía de cizallamiento para fragmentar partículas de mayor tamaño en unas más pequeñas. En un proceso típico de homogeneización, las partículas se hacen recircular a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan los tamaños de partícula seleccionados, habitualmente entre aproximadamente 60 y 80 nm. En ambos métodos, la distribución del tamaño de las partículas puede monitorizarse mediante discriminación de partícula por haz láser convencional, o QELS.

La extrusión de las partículas a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o una membrana cerámica asimétrica es también un método efectivo para reducir los tamaños de partícula a una distribución de tamaño relativamente bien definida. Habitualmente, la suspensión se sometió a ciclos a través de la membrana una o más veces hasta que se logró la distribución del tamaño de partícula deseada. Las partículas pueden ser extruidas a través de membranas de poros cada vez más pequeños, para lograr una reducción gradual del tamaño.

En otro grupo de realizaciones, se describe en la presente patente un método para la preparación de partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero, que comprende:

(a) preparar una mezcla que comprende lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos en un disolvente orgánico;

(b) poner en contacto una solución acuosa de ácido nucleico con dicha mezcla en la etapa (a) para proporcionar una fase única transparente; y

(c) eliminar dicho disolvente orgánico para proporcionar una suspensión de partículas de ácido nucleico-lípido, en donde dicho ácido nucleico está encapsulado en una bicapa lipídica, y dichas partículas son estables en suero y tienen un tamaño de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 nm.

Los ácidos nucleicos (o plásmidos), lípidos catiónicos y lípidos no catiónicos que son de utilidad en este grupo de modos de realización son tal como los que se describen anteriormente para los métodos de diálisis con detergente.

La selección de un disolvente orgánico implicará, generalmente, la consideración de la polaridad del disolvente y la facilidad con la que el disolvente puede eliminarse en las etapas más tardías de la formación de partículas. El disolvente orgánico, que también se utiliza como agente solubilizante, se encuentra en una cantidad suficiente para proporcionar una mezcla de fase única transparente de ácido nucleico y lípidos. Los disolventes adecuados incluyen, pero no se limitan a, 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. Las combinaciones de dos o más disolventes pueden también utilizarse en la presente invención.

Se logra poner en contacto el ácido nucleico con la solución orgánica de lípidos catiónicos y no catiónicos mezclando entre sí una primera solución de ácido nucleico, que es habitualmente una solución acuosa, y una segunda solución orgánica de los lípidos. Un experto en el arte entenderá que este mezclado puede llevarse a cabo mediante una gran cantidad de métodos, por ejemplo mediante medios mecánicos tales como la utilización de agitadores vórtex.

Después de que el ácido nucleico se haya puesto en contacto con la solución orgánica de lípidos, el disolvente orgánico se elimina, formando de ese modo una suspensión acuosa de partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero. Los métodos utilizados para eliminar el disolvente orgánico implicarán habitualmente la evaporación a presiones reducidas o inyectar un flujo de un gas inerte (*por ejemplo*, nitrógeno o argón) a través de la mezcla.

Las partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero formadas de este modo tendrán habitualmente un tamaño de aproximadamente 50 nm a 150 nm. Para lograr una mayor reducción u homogeneidad del tamaño de las partículas, el dimensionamiento puede realizarse según se ha descrito anteriormente.

En otros modos de realización, los métodos comprenderán además añadir policationes no lipídicos que son útiles para efectuar la administración a las células utilizando las presentes composiciones. Ejemplos de policationes no lipídicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, bromuro de hexadimetrina (vendido bajo la marca POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA) u otras sales de heaxadimetrina. Otros

policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina y polietilenimina.

En determinados modos de realización, la formación de partículas de ácido nucleico-lípido puede realizarse ya sea en un sistema monofásico (por ejemplo, una monofase por el método de Bligh y Dyer monophase o una mezcla similar de disolventes acuosos y orgánicos) o en un sistema bifásico con un mezclado adecuado.

Cuando la formación de los complejos se lleva a cabo en un sistema monofásico, cada uno de los lípidos catiónicos y los ácidos nucleicos se disuelven en un volumen de la mezcla monofásica. La combinación de dos soluciones proporciona una única mezcla en la que los complejos se forman. De manera alternativa, los complejos pueden formarse en mezclas bifásicas en las que los lípidos catiónicos se unen al ácido nucleico (que está presente en la fase acuosa), y lo “atraen” hacia la fase orgánica.

En otro modo de realización, se describe en la presente patente un método para la preparación de partículas de ácido nucleico-lípido, que comprende:

(a) poner en contacto ácidos nucleicos con una solución que comprende lípidos no catiónicos y un detergente para formar una mezcla de ácido nucleico-lípido;

(b) poner en contacto ácidos 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 carga neutra de ácidos nucleicos y lípidos; y

(c) eliminar el detergente de la mezcla de carga neutra para proporcionar las partículas de ácido nucleico-lípido en las que los ácidos nucleicos están protegidos de la degradación.

En un grupo de modos de realización, la solución de lípidos no catiónicos y detergente es una solución acuosa. Se logra poner en contacto los ácidos nucleicos con la solución de lípidos no catiónicos y detergente habitualmente mezclando entre sí una primera solución de ácidos nucleicos y una segunda solución de lípidos y detergente. Un experto en el arte entenderá que esta mezcla puede llevarse a cabo mediante un gran número de métodos, por ejemplo, mediante medios mecánicos tales como utilizando agitadores vórtex. Preferiblemente, la solución de ácido nucleico es también una solución detergente. La cantidad de lípido no catiónico que se utiliza en el presente método se determina habitualmente en base a la cantidad de lípido catiónico utilizado, y es habitualmente de aproximadamente 0,2 a 5 veces la cantidad de lípido catiónico, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 veces la cantidad de lípido catiónico utilizado.

En algunos modos de realización, los ácidos nucleicos se encuentran previamente condensados según se describe en, *por ejemplo*, la Solicitud de Patente estadounidense Nº 09/744.103.

La mezcla de ácido nucleico-lípido formada de este modo 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 polianiónicos) presentes. La cantidad de lípidos catiónicos utilizados será habitualmente suficiente para neutralizar al menos el 50% de la carga negativa del ácido nucleico. Preferiblemente, la carga negativa será al menos un 70% neutra, más preferiblemente al menos un 90% neutra. Los lípidos catiónicos que son útiles en la presente invención, incluyen, por ejemplo, DODAC, DOTMA, DDAB, DOTAP, DC-Chol y DMRIE. Estos lípidos y análogos relacionados han sido descritos en las patentes estadounidenses Nos. 5.208.036, 5.264.618, 5.279.833, 5.283.185, 5.753.613 y 5.785.992.

Se puede lograr poner en contacto lípidos con la mezcla de ácido nucleico-lípido mediante una gran cantidad de técnicas, preferiblemente mezclando entre sí una solución de lípido catiónico y una solución que contiene la mezcla de ácido nucleico-lípido. Tras mezclas las dos soluciones (o ponerlas en contacto de alguna otra manera), se neutraliza una parte de la carga negativa asociada con el ácido nucleico. Sin embargo, el ácido nucleico permanece en un estado no condensado y adquiere características hidrófilas.

Después de que los lípidos catiónicos se han puesto en contacto con la mezcla de ácido nucleico-lípidos, el detergente (o una combinación de detergente y un disolvente orgánico) se elimina, formando de este modo las partículas de ácido nucleico-lípido. Los métodos utilizados para eliminar el detergente implicarán habitualmente diálisis. Cuando los disolventes están presentes, la retirada se lleva a cabo habitualmente por evaporación a presiones reducidas o inyectando una corriente de gas inerte (por ejemplo, nitrógeno o argón) a través de la mezcla.

Las partículas así formadas tendrán un tamaño habitual de aproximadamente 100 nm a diversas micras. Para lograr una reducción de tamaño y homogeneidad adicionales de las partículas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden ser sonicadas, filtradas o sometidas a otras técnicas de dimensionamiento que se utilizan en las formulaciones liposomales y que son conocidas por los expertos en el arte.

En otros modos de realización, los métodos comprenderán además añadir policationes no lipídicos que son útiles para efectuar la lipofección de células utilizando las presentes composiciones. Ejemplos de policationes no lipídicos adecuados incluyen, bromuro de hexadimetrina (vendido bajo la marca POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, USA) u otras sales de heaxadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina y polietilenimina. La adición de estas sales se realiza preferiblemente después de que las partículas se hayan formado.

En otro aspecto, se describen en la presente patente métodos para la preparación de partículas de ácido nucleico-lípido, que comprenden:

(a) poner en contacto una cantidad de lípidos catiónicos con ácidos nucleicos en una solución; donde la solución comprende de aproximadamente 15-35% de agua y aproximadamente 65-85% de disolvente orgánico y donde la cantidad de lípidos catiónicos es suficiente para producir una relación de carga +/- de aproximadamente 0,85 a aproximadamente 2,0, para proporcionar un complejo de ácido nucleico-lípido hidrófobo;

(b) poner en contacto el complejo de ácido nucleico-lípido hidrófobo en solución, con lípidos no catiónicos para proporcionar una mezcla de ácido nucleico-lípido; y

(c) eliminar los disolventes orgánicos de la mezcla de ácido nucleico-lípido para proporcionar partículas de ácido nucleico-lípido en las que los ácidos nucleicos están protegidos de la degradación.

Los ácidos nucleicos, lípidos no catiónicos, lípidos catiónicos y disolventes orgánicos que son de utilidad en este aspecto de la invención, son los mismos que los descritos para los métodos anteriores que utilizaban detergentes. En un grupo de realizaciones, la solución de la etapa (a) es una mono-fase. En otro grupo de realizaciones, la solución de la etapa (a) es bifásica.

En modos de realización preferidos, los lípidos catiónicos son DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS o combinaciones de los mismos. En otros modos de realización preferidos, los lípidos no catiónicos son ESM, DOPE, DOPC, DSPC, polímeros a base de polietilenglicol (*por ejemplo*, PEG 2000, PEG 5000, diacilgliceroles modificados con PEG, o dialquiloxipropilos modificados con PEG), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, o combinaciones de los mismos. En aún otros modos de realización preferidos, los disolventes orgánicos son metanol, cloroformo, cloruro de metileno, etanol, éter dietílico o combinaciones de los mismos.

En un modo de realización, el ácido nucleico es un plásmido a partir del cual se transcribe un ARN de interferencia; el lípido catiónico es DODAC, DDAB, DOTMA, DOSPA, DMRIE, DOGS o combinaciones de los mismos; el lípido no catiónico es ESM, DOPE, DAG-PEG, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, o combinaciones de los mismos (*por ejemplo* DSPC y DAG-PEG); y el disolvente orgánico es metanol, cloroformo, cloruro de metileno, etanol, éter dietílico o combinaciones de los mismos.

Al igual que anteriormente, poner en contacto los ácidos nucleicos con los lípidos catiónicos se logra habitualmente mezclando entre sí una primera solución de ácidos nucleicos y una segunda solución de lípidos, preferiblemente mediante medios mecánicos tales como utilizando agitadores vórtex. La mezcla resultante contiene complejos como según describe anteriormente. Estos complejos se convierten entonces en partículas mediante la adición de lípidos no catiónicos y la eliminación del disolvente orgánico. La adición del lípido no catiónico se logra habitualmente, simplemente añadiendo una solución de los lípidos no catiónicos a la mezcla que contiene los complejos. Una adición inversa puede también utilizarse. La posterior eliminación de los disolventes orgánicos puede lograrse mediante métodos conocidos por los expertos en el arte y también se describen anteriormente.

La cantidad de lípidos no catiónicos que se utiliza en este aspecto de la invención es habitualmente una cantidad de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 15 veces la cantidad (en base molar) de los lípidos catiónicos que se utilizó para proporcionar el complejo ácido nucleico-lípido de carga neutra. Preferiblemente, la cantidad es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 9 veces la cantidad de lípidos catiónicos utilizados.

En aún otro aspecto, en la presente patente se describen partículas de ácido nucleico-lípido que se preparan mediante los métodos descritos anteriormente. En estos modos de realización, las partículas de ácido nucleico-lípido o bien tienen carga neutra o llevan una carga total que provee a las partículas de una mayor actividad de lipofección génica. Preferiblemente, el componente de ácido nucleico de las partículas es un ácido nucleico que interfiere en la producción de una proteína no deseada. En un modo de realización preferido, el ácido nucleico comprende un ARN de interferencia, el lípido no catiónico es esfingomielina de huevo y el lípido catiónico es DODAC. En un modo de realización preferido, el ácido nucleico comprende un ARN de interferencia, el lípido no catiónico es una mezcla de DSPC y colesterol, y el lípido catiónico es DOTMA. En otros modos de realización preferidos, el lípido no catiónico puede además comprender colesterol.

Una variedad de métodos generales para realizar SNALP-CPL (SNALP que contienen CPL) se discuten en la presente patente. Dos técnicas generales incluyen la técnica de "post-inserción", es decir, la inserción de un CPL en por ejemplo, una SNALP pre-formada, y la técnica "estándar", en donde el CPL se incluye en la mezcla lipídica durante por ejemplo, las etapas de formación de las SNALP. La técnica de post-inserción tiene como resultado SNALP con CPL principalmente en la cara externa de la membrana bicapa de la SNALP, mientras que las técnicas estándar proporcionan SNALP con CPL tanto en las caras internas como en las externas. El método es especialmente útil para vesículas realizadas de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y además para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAG). Se describen métodos de realización de SNALP-CPL, por ejemplo, en las Patentes estadounidenses Nos. 5.705.385, 6.586.410, 5.981.501 y 6.534.484; en las solicitudes estadounidenses Nos. 09/553,639 y 09/839,707 (publicadas como U.S.P.A. Publicación Nº 2002/0072121), además de en la Solicitud Internacional PCT PCT/CA00/00451 (publicada como WO 00/62813).

Las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención pueden ser administradas solas o en una mezcla con un soporte fisiológicamente aceptable (tal como suero salino fisiológico o tampón de fosfato), seleccionado de acuerdo con la vía de administración y la práctica farmacéutica estándar. Generalmente, el suero fisiológico se empleará como el soporte farmacéuticamente aceptable. Otros soportes adecuados incluyen, *por ejemplo*, agua, agua tamponada, suero salino al 0,4%, glicina al 0,3%, y similares, incluyendo glicoproteínas para una estabilidad mejorada, tales como la albúmina, lipoproteína, globulina, etc.

El soporte farmacéutico se añade generalmente después de la formación de partículas. De este modo, después de que la partícula se forme, la partícula puede ser diluida en soportes farmacéuticamente aceptables tales como el suero fisiológico.

La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas pueden variar ampliamente, *es decir*, desde menos del 0,05%, usualmente en o al menos aproximadamente un 2,5% hasta un 10 a un 30% en peso, y será seleccionada principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el particular modo de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede ser aumentad para disminuir la carga de fluidos asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva o hipertensión severa asociadas a la aterosclerosis. De manera alternativa, las partículas compuestas de lípidos irritantes pueden diluirse a bajas concentraciones para reducir la inflamación en el sitio de administración.

Tal como se describe anteriormente, en algunos modos de realización de la presente invención, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden conjugados DAG-PEG. En otros modos de realización de la invención, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden conjugados de PEG-dialquiloxi propilo. Resulta deseable a menudo incluir otros componentes que actúen de forma similar a la de los conjugados DAG-PEG o conjugados PEG-dialquiloxipropilo, y que sirvan para prevenir la agregación y proporcionar un medio para aumentar el tiempo de vida en la circulación e incrementar la administración de las partículas de ácido nucleico-lípido a los tejidos diana. Tales componentes incluyen, pero no se limitan a, conjugados PEG-lípido, tales como PEG-ceramidas o PEG-fosfolípidos (tales como PEG-PE), lípidos modificados con gangliósido GM1 o lípidos ATTA a las partículas. Habitualmente, la concentración del componente en la partícula será de aproximadamente 1-20% y, más preferiblemente de aproximadamente un 3-10%.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente invención pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, donde la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa previamente a su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiere para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como el agentes tampón y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro potásico y cloruro de calcio. Adicionalmente, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra los radicales libres y los daños peroxidativos a los lípidos en su almacenamiento. Son adecuados extintores de radicales libres lipófilos, tales como el alfatocoferol y quelantes específicos para el hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

V. Administración de las SNALPs

Las SNALPs descritas en la presente patente pueden utilizarse convenientemente para introducir los ácidos nucleicos en células (*por ejemplo*, para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de un gen diana). Por consiguiente, se describen en la presente patente métodos para introducir un ácido nucleico (*por ejemplo*, un ARN de interferencia) en una célula. Los métodos se realizan *in vitro* o *in vivo* formando en primer lugar las partículas tal como se describe anteriormente, a continuación poniendo en contacto las partículas con las células durante un periodo de tiempo suficiente para que tenga lugar la administración del siARN.

Las SNALP descritas en la presente patente pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula con la que se mezclan o entran en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden ser endocitosadas por una parte de las células, intercambiar lípidos con las membranas celulares, o bien fusionarse con las células. La transferencia o

incorporación de la parte de ácido nucleico de la partícula puede tener lugar a través de cualquiera de estas vías. En particular, cuando la fusión tiene lugar, la membrana de la partícula se integra en la membrana celular y los contenidos de la partícula se combinan con el fluido intracelular.

Entre los tipos de célula establecidos como diana con más frecuencia para la administración intracelular de un SiARN, se encuentran las células neoplásicas (*por ejemplo*, células tumorales) y hepatocitos. Otras células que pueden fijarse como diana son, *por ejemplo*, células precursoras (madres) hematopoyéticas, fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos, células endoteliales, células del músculo liso y esquelético, osteoblastos, neuronas, linfocitos quiescentes, células terminales diferenciadas, células primarias lentas o no cíclicas, células parenquimales, células linfoides, células epiteliales, células óseas, y similares. En un modo de realización preferido, se fijan como diana los hepatocitos.

Se conoce bien en el arte en qué grado el cultivo de células puede ser requerido. Freshney (1994) (Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, third edition Wiley-Liss, New York), Kuchler et al. (1977) Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Kuchler, R.J., Dowden, Hutchinson y Ross, Inc., y las referencias citadas en los mismos proporcionan una guía general de cultivo de células. Los sistemas celulares cultivados estarán con frecuencia en forma de monocapas de células, aunque también se utilizan suspensiones celulares.

A. Transferencia de genes *in vitro*

Para aplicaciones *in vitro*, la administración de siARN puede realizarse en cualquier cultivo celular, ya sea de origen animal o vegetal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En modos de realización preferidos, las células serán células animales, más preferiblemente células de mamíferos, y de mayor preferencia 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 dependiendo de la aplicación en particular, pero es generalmente de entre aproximadamente 1µmol 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 modos de realización preferidos, se añade una suspensión de partículas de ácido nucleico-lípido a células en placas confluentes en un 60-80% con una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/mL, más preferiblemente aproximadamente 2 x 10^4 células/mL. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 µg/mL, más preferiblemente aproximadamente 0,1 µg/mL.

Utilizando un ensayo de parámetros de liberación endosomal (ERP), puede optimizarse la eficacia del sistema de administración de la SNALP o de otro sistema portador a base de lípidos. Un ensayo de ERP se describe en detalle en la Solicitud de Patente estadounidense Nº 10/136.707 (publicada como U.S.P.A. Nº de Publicación 2003/0077829). Más en particular, el propósito de un ensayo de 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/desestabilización de la membrana endosomal. Este ensayo nos permite determinar cuantitativamente cómo cada componente de la SNALP o de otro sistema portador a base de lípidos logra la eficacia de la administración, optimizando de ese modo las SNALP o los otros sistemas portadores a base de lípidos. Habitualmente, un ensayo de ERP mide la expresión de una proteína indicadora (*por ejemplo*, luciferasa, β-galactosidasa, proteína verde fluorescente, etc.), y en algunos casos, una formulación de SNALP optimizada para un plásmido de expresión será apropiada también para encapsular un ARN de interferencia. En otros casos, un ensayo de ERP puede adaptarse para medir la regulación por disminución de la traducción de una secuencia diana en presencia o ausencia de un ARN de interferencia. Comparando los ERP para cada uno de los diversos SNALP u otras formulaciones a base de lípidos, se puede determinar fácilmente el sistema optimizado, *por ejemplo*, la SNALP u otra formulación a base de lípidos que presente la mayor captación en la célula.

Los marcadores adecuados para realizar el ensayo de ERP descrito en la presente patente incluyen, pero no se limitan a, marcadores espectrales, tales como colorantes fluorescentes (*por ejemplo*, fluoresceína y derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y verde Oregón™; rodamina y derivados, tales como rojos Texas, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™, y similares; radiomarcadores, tales como ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C ^{32}P ^{33}P etc.; enzimas, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.; marcadores colorimétricos espectrales, tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas plásticas, tales como poliestireno, polipropileno, látex, etc. El marcador puede ser acoplado directamente o indirectamente a un componente de la SNALP u otro sistema portador a base de lípidos, utilizando métodos bien conocidos en el arte. Tal como se indica anteriormente, puede utilizarse una amplia variedad de marcadores, donde la elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el componente SNALP, requerimientos de estabilidad, e instrumentación disponible y previsiones para la eliminación.

B. Transferencia de genes *in vivo*

En algunos modos de realización, las SNALPs pueden ser utilizadas para la administración *in vivo* de siARN a una amplia variedad de vertebrados, incluyendo mamíferos tales como los caninos, felinos, equinos, bovinos, roedores, lagomorfos, porcinos, primates, incluyendo, *por ejemplo*, humanos. La administración *in vivo* de las SNALPs puede ser local (*es decir*, directamente al sitio de interés) o sistémica (*es decir*, distal del sitio de interés).

La administración sistémica para la terapia génica *in vivo*, *es decir*, la administración de un ácido nucleico terapéutico a una célula diana distal a través de los sistemas del organismo, tales como la circulación, se ha logrado utilizando partículas de ácido nucleico-lípido tales como los revelados en la Solicitud de Patente PCT publicada WO 96/40964, las patentes estadounidenses Nos. 5.705.385, 5.976.567, 5.981.501, y 6.410.328. Este último formato proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido totalmente encapsulada que protege el ácido nucleico de la degradación de la nucleasa en suero, es no inmunogénica, pequeña en tamaño y es adecuada para la dosificación repetida.

Las SNALPs descritas en la presente patente pueden administrarse a través de cualquier vía conocida en el arte incluyendo, *por ejemplo*, por vía intravenosa, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, oral, intranasal, o tópica. Por ejemplo, Zhu, et al., Science 261:209 (1993) describe la administración intravenosa de complejos de plásmido-lípidos catiónicos; Hyde, et al., Nature 362:250 (1993) describe la administración intranasal de complejos de plásmido-liposoma (*es decir*, lipoplejos); y Brigham, et al., Am. J. Med. Sci. 298:278 (1989), describe la administración intravenosa e intratraqueal de complejos de plásmido-lípidos catiónicos. Las SNALPs pueden administrarse solas o en una mezcla con un soporte fisiológicamente aceptable (tal como suero fisiológico o tampón de fosfato), seleccionado de acuerdo a la vía de administración y la práctica farmacéutica estándar.

Cuando se preparan las preparaciones farmacéuticas de las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención, es preferible utilizar cantidades de partículas de ácido nucleico-lípido que hayan sido purificadas para reducir o eliminar partículas lipídica vacías o partículas con una parte de ácido nucleico asociada con la superficie externa. El soporte farmacéutico se añade generalmente a continuación de la formación de partículas. Por tanto, después de que la partícula se forme, la partícula puede diluirse en forma de soportes farmacéuticamente aceptables.

La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas pueden variar ampliamente, *es decir*, desde menos de aproximadamente un 0,05 %, habitualmente en o al menos aproximadamente un 2,5 % hasta un 10 a 30 % en peso y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el particular modo de administración seleccionado.

La cantidad de partículas administradas dependerá de la relación de ácido nucleico con respecto al lípido; el ácido nucleico en particular utilizado, el estado de la enfermedad que se diagnostica; la edad, el peso, y la condición del paciente y el juicio del clínico; pero generalmente estará entre aproximadamente un 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal; preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal 10^8-10^{10} partículas por inyección.

1. Administración inyectable

En determinadas circunstancias será deseable administrar las SNALPs reveladas en la presente patente por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, o intraperitoneal según se describe en la patente estadounidense 5.543.158; patente estadounidense 5.641.515 y patente estadounidense 5.399.363. Las SNALPs pueden inyectarse localmente en el sitio de interés (*por ejemplo*, un sitio de la enfermedad tal como una inflamación o neoplasia o en cualquier órgano o tejido diana), o inyectarse de forma sistémica para su amplia distribución por todo el organismo. Las soluciones de las SNALPs pueden prepararse en agua mezclada de forma adecuada con un tensioactivo. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. Habitualmente, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos. Generalmente, cuando se administra por vía intravenosa, las formulaciones de ácido nucleico-lípido se formulan con un soporte farmacéutico aceptable. En general, el suero fisiológico tamponado (135-150 mM NaCl) se empleará como el soporte farmacéuticamente aceptable, pero también bastarán otros soportes adecuados. Se describen soportes adecuados adicionales en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Tal como se utiliza en la presente patente, "soporte" incluye cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides, y similares. La frase "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa alérgica o similar cuando se administra a un humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como ingrediente activo se comprende bien en el arte. Habitualmente, tales composiciones se preparan como inyectables, ya sea como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su solución en, o suspensión en, líquido antes de la inyección. La preparación puede también emulsionarse.

Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización liposomal convencionales, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tampón y de ajuste del pH, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes y similares. Estas composiciones pueden ser esterilizadas utilizando las técnicas a las que se hace referencia anteriormente o, de manera alternativa, pueden producirse bajo condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, donde la preparación liofilizada se combina con una solución acuosa previamente a la administración.

2. Administración oral

En determinadas aplicaciones, las SNALP reveladas en la presente patente pueden ser administradas mediante una administración por vía oral al individuo. Los compuestos activos pueden incluso tener excipientes incorporados y ser utilizados en forma de comprimidos que pueden ingerirse, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, enjuagues bucales, suspensiones, pulverizadores orales, siropes, obleas, y similares (Mathiowitz et al., 1997; Hwang et al., 1998; la patente estadounidense 5.641.515; patente estadounidense 5.580.579 y patente estadounidense 5.792.451). Los comprimidos, pastillas, píldoras, cápsulas y similares pueden contener también lo siguiente: aglutinantes, gelatina; excipiente, lubricantes, o agentes aromatizantes. Cuando la forma de la unidad de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, un soporte líquido. Otros diversos materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material utilizado en la preparación de cualquier forma de unidad de dosificación debería ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas.

Habitualmente, estas formulaciones pueden contener al menos aproximadamente 0,1 % del compuesto activo o más, aunque el porcentaje del ingrediente o ingredientes activos puede, por supuesto, variar y puede estar entre aproximadamente un 1 o 2% y aproximadamente un 60% o 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de compuesto o compuestos activos en cada composición terapéuticamente útil puede ser preparada de tal manera que se obtendrá una dosis adecuada en cualquier unidad de dosificación determinada del compuesto. Factores como la solubilidad, biodisponibilidad, vida media biológica, vía de administración, vida en almacenamiento del producto, además de otras consideraciones farmacológicas, serán contempladas por los expertos en el arte de la preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y como tales, podrá ser deseable una variedad de regímenes de dosificación y tratamiento.

3. Administración nasal

En determinados modos de realización, las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas mediante pulverizaciones intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de administración con aerosol. Se han descrito métodos para la administración composiciones de ácido nucleico directamente a los pulmones a través de pulverizadores de aerosoles nasales *por ejemplo,* en la patente estadounidense 5.756,353 y patentes estadounidense 5.804.212. Igualmente, la administración de fármacos utilizando resinas de micropartículas intranasales (Takenaga et al., 1998) y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente estadounidense 5.725.871) se conocen bien en el arte farmacéutico. De igual manera, la administración de fármacos por vía transmucosa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente estadounidense 5.780.045.

4. Administración por vía tópica

En otro ejemplo de su uso, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden incorporarse en una amplia gama de formas de dosificación tópicas incluyendo, pero sin limitarse a, geles, aceites, emulsiones y similares. Por ejemplo, la suspensión que contiene las partículas de ácido nucleico-lípido puede ser formulada y administrada como cremas tópicas, pastas, ungüentos, geles, lociones y similares.

C. Tratamiento profiláctico y terapéutico

En algunos modos de realización, las SNALP pueden utilizarse para el tratamiento profiláctico o terapéutico de sujetos (por ejemplo, sujetos mamíferos) con una enfermedad o trastorno asociado con la expresión o sobreexpresión de una secuencia diana. Las SNALP se administran al sujeto en una cantidad suficiente para suscitar una respuesta terapéutica en el paciente. Una cantidad adecuada para lograr esto se define como “cantidad o dosis terapéuticamente efectiva” o “cantidad o dosis efectiva”. A la hora de determinar la cantidad efectiva de la SNALP a ser administrada en el tratamiento o profilaxis de las condiciones debidas a la expresión o sobreexpresión del gen diana, el médico evalúa los niveles de las SNALP en plasma que circulan, la toxicidad de las SNALPs, y la progresión de la enfermedad asociada con la expresión o sobreexpresión del gen diana. La administración puede lograrse mediante una dosis única o dosis divididas.

Por ejemplo, la SNALP puede administrarse a un sujeto infectado con, o en riesgo de ser infectado con un microorganismo patogénico. El siARN debería corresponder, preferiblemente, a una secuencia que juega un papel

esencial en el ciclo de vida del microorganismo, y debería ser único al microorganismo (o al menos ausente del genoma del propio genoma natural de un paciente que está sometido a terapia). El complejo de ácido nucleico-lípido se introduce en células, tejido, u órganos diana, ya sea *ex vivo* o mediante inyección intravenosa en una dosis terapéuticamente efectiva. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con la infección patogénica puede ser utilizado convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales utilizados para tratar la condición patogénica. El tratamiento puede ser administrado de forma profiláctica a personas en riesgo de ser infectadas con el microorganismo patogénico o a personas ya infectadas con el microorganismo patogénico.

En un modo de realización preferido, las composiciones y métodos de la invención pueden ser utilizadas convenientemente para tratar trastornos del hígado tales como, por ejemplo, hepatitis. Por ejemplo, sitios adecuados para la inhibición del virus de la Hepatitis B incluyen secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas S, C, P, y X, PRE, EnI, y EnII (*ver, por ejemplo*, FIELDS VIROLOGY, 2001, *supra*). Un experto en el arte apreciará que el silenciamiento de genes asociado con la infección por hepatitis puede combinarse con tratamientos convencionales para la hepatitis tales como, por ejemplo, inmunoglobulina, interferón (*por ejemplo*, interferón α pegilado y no pegilado) (*ver, por ejemplo*, Medina et al., Antiviral Res.60(2):135-143 (2003); ribavirina (*ver, por ejemplo*, Hugle and Cerny, Rev. Med. Virol. 13(6):361-71(2003); adefovir y lamivudina (*ver, por ejemplo*, Kock et al., Hepatology 38(6):1410-8 (2003); inhibidores de la prenilación (*ver, por ejemplo*, Bordier et al., J. Clin. Invest. 112(3): 407-414 (2003)); famciclovir (*ver, por ejemplo*, Yurdaydin et al., J Hepatol. 37(2):266-71 (2002); y saikosaponinas c y d (*ver por ejemplo*, Chiang et al., Planta Med. 69(8):705-9 (2003).

En otro ejemplo de realización, el microorganismo patogénico es el VIH. Por ejemplo, los sitios adecuados para la inhibición en el virus VIH incluyen TAR, REV o nef (Chatterjee et al., Science 258:1485-1488 (1992)). Rev es una proteína de unión al ARN regulador que facilita la exportación desde el núcleo del pre-ARN del VIH sin corte y empalme. Malim et al., Nature 338:254 (1989). Se cree que Tat es un activador transcripcional que funciona uniendo una secuencia de reconocimiento en el ARNm flanqueador en el extremo 5'. Karn & Graeble, Trends Genet. 8:365 (1992). El complejo de ácido nucleico-lípido se introduce en los leucocitos o células madre hematopoyéticas, ya sea ex vivo o mediante inyección intravenosa en una dosis terapéuticamente efectiva. El tratamiento puede ser administrado de manera profiláctica a personas con riesgo de ser infectadas con el VIH, o a personas ya infectadas con el VIH. Se utilizan métodos análogos para suprimir la expresión genes de células receptoras endógenas que codifican proteínas de adhesión.

En otro modo de realización, las composiciones y métodos descritos en la presente patente pueden utilizarse convenientemente para tratar enfermedades y trastornos caracterizados por la expresión y sobreexpresión de un gen o grupo de genes. En algunos aspectos, las composiciones y métodos descritos en la presente patente pueden utilizarse para tratar enfermedades y trastornos metabólicos (*por ejemplo*, enfermedades y trastornos en los que el hígado en una diana, y enfermedades y trastornos del hígado), tales como, por ejemplo, la dislipidemia y la diabetes. Un experto en el arte apreciará que el silenciamiento de genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos puede combinarse con tratamientos convencionales para estos trastornos. Por ejemplo, el silenciamiento de genes implicado en la dislipidemia puede combinarse con un tratamiento con, por ejemplo, estatinas, secuestrantes de ácido biliar/resinas e inhibidores de la absorción del colesterol tales como ezetimiba, estanoles vegetales /esteroles, polifenoles, además de nutracéuticos tales como salvado de avena, proteínas de zaragatona y soja, análogos de fitoestanol, inhibidores de escualeno sintasa, inhibidores del transporte del ácido biliar, ligandos activadores de la proteína activadora por corte de SREBP (SCALP), ácido nicotínico (niacina), acipimox, aceites de pescado en dosis elevadas, antioxidantes y policosanol, inhibidores de la proteína microsomal de transferencia de triglicéridos (MTP), acilcoenzima A: inhibidores de colesterol aciltransferasa (ACAT), gemcabeno, lifibrol, análogos del ácido pantoténico, agonistas del receptor del ácido nicotínico, agentes antiinflamatorios (tales como antagonistas de Lp-PLA(2) y AGI1067), aceites funcionales, agonistas de PPAR- -α, -γ, -δ, además de agonistas de PPAR-α,/γ doble y PPAR-α /γ,/δ 'pan', inhibidores de la proteína de transferencia del éster de colesterilo (CETP) (tal como torcetrapib), vacunas de CETP, reguladores por incremento del transportador del casete de unión a ATP (ABC) A1, lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT) y receptor scavenger (depurador) clase B Tipo 1 (SRB1), además de péptidos relacionados con la apolipoproteína sintética (Apo)E, niacina/lovastatina de liberación prolongada, atorvastatina/amlodipina, ezetimiba/simvastatina, atorvastatina/inhibidor de CETP, agonistas de estatina/PPAR, niacina/ simvastatina de liberación prolongada y pravastatina/aspirina se encuentran en desarrollo, y agentes anti-obesidad, (*ver, por ejemplo*, Bays y Stein, Expert Opin. Pharmacother. 4(11):1901-38 (2003)). De igual manera, el silenciamiento de genes implicado en la diabetes puede combinarse con el tratamiento con insulina además de con la modificación de la dieta y ejercicio.

Se utilizan métodos análogos para la supresión de la expresión de genes de células receptoras endógenas asociadas con la tumorigénesis y la transformación celular, crecimiento celular, y migración tumoral; genes angiogénicos; genes inmunomoduladores, tales como los asociados con respuestas inflamatorias y autoinmunes; genes receptores de ligandos; genes asociaos con trastornos neurodegenerativos; y genes adicionales asociados con una infección vírica y la supervivencia viral. Las secuencias de genes diana de particular interés están descritas anteriormente.

D. Detección de SNALP

En algunos modos de realización, las partículas de ácido nucleico-lípido se pueden detectar en plasma y/o células del sujeto 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, o 96 horas después de la administración de las partículas. La presencia de partículas puede ser detectada mediante cualquier medio conocido en el arte incluyendo, por ejemplo, la detección directa de partículas, detección de la secuencia de ARN de interferencia, detección de la secuencia diana de interés (*es decir*, detectando la expresión o la expresión reducida de la secuencia de interés), o una combinación de los mismos.

1. Detección de partículas

Las partículas de ácido nucleico-lípido se detectan en la presente patente utilizando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, un marcador puede acoplarse directa o indirectamente a un componente de la SNALP u otro sistema portador que utiliza métodos bien conocidos en el arte. Puede utilizarse una amplia variedad de marcadores, donde la elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el componente SNALP, requerimientos de estabilidad, e instrumentación disponible y previsiones para la eliminación. Entre los marcadores adecuados se incluyen, pero sin limitarse a, marcadores espectrales, tales como colorantes fluorescentes (*por ejemplo*, fluoresceína y derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y verde Oregón™; rodamina y derivados, tales como rojo Texas, isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™, y similares; radiomarcadores, tales como ^{3}H, ^{125}I, ^{35}S, ^{14}C ^{32}P ^{33}P etc.; enzimas, tales como peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, etc.; marcadores colorimétricos espectrales, tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas plásticas, tales como poliestireno, polipropileno, látex, etc. El marcador puede ser acoplado utilizando cualquier medio conocido en el arte.

2. Detección de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos se detectan y cuantifican en la presente patente mediante una serie de medios bien conocidos para los expertos en el arte. La detección de ácidos nucleicos se desarrolla mediante métodos bien conocidos tales como análisis Southern, análisis northern, electroforesis en gel, PCR, radiomarcadores, conteo de centelleo, y cromatografía de afinidad. También pueden emplearse métodos bioquímicos analíticos adicionales, tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía de alto rendimiento (HLPC), cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de hiperdifusión.

La selección de un formato de hibridación de un ácido nucleico no es algo crítico. Se conocen bien por parte de los expertos en el arte una variedad de formatos de hibridación del ácido nucleico. Por ejemplo, formatos comunes incluyen ensayos tipo sándwich y ensayos de competición o desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen en general en "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Ed. Hames, B.D. y Higgins, S.J., IRL Press, 1985.

La sensibilidad de los ensayos de hibridación puede incrementarse mediante el uso de un sistema de amplificación de ácidos nucleicos que multiplica el ácido nucleico que está siendo detectado. Son conocidas las técnicas de amplificación *in vitro* adecuadas para amplificar las secuencias para su uso como sondas moleculares o para generar fragmentos de ácido nucleico para su posterior sub-clonación. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de tales métodos de amplificación *in vitro*, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasas (LCR), amplificación por Qβ-replicasa y otras técnicas mediadas por la 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, una empresa conjunta entre Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc., (2002), además de Mullis et al. (1987), Patente estadounidense Nº 4.683.202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (October 1, 1990), C&EN 36; 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 and Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990), y Sooknanan y Malek, Biotechnology, 13:563 (1995). Se describen métodos mejorados de clonación *in vitro* de ácidos nucleicos amplificados en Wallace et al., patente estadounidense Nº 5.426.039. Otros métodos descritos en el arte son la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y sistemas de Q Beta-Replicasa.

Los oligonucleótidos 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 habitualmente químicamente de acuerdo con el método de triéster de fosforamidita en fase sólida descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letts., 22(20):1859 1862 (1981), *por ejemplo*, utilizando un sintetizador automático, según se describe en Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984). La purificación de oligonucleótidos, cuando es necesaria, se realiza habitualmente mediante electroforesis en gel de acrilamida nativa o bien mediante HPLC con intercambio de aniones, según se describe en Pearson y Regnier, J. Chrom., 255:137 149 (1983). La secuencia de los

oligonucleótidos sintéticos puede verificarse utilizando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman y Moldave (eds.) Academic Press, New York, Methods in Enzymology, 65:499.

Un medio alternativo para determinar el nivel de traducción es la hibridación *in situ*. Los ensayos de hibridación in situ se conocen bien y se describen en general en Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649 (1987). En un ensayo de hibridación in situ las células se fijan a un soporte sólido, habitualmente un portaobjetos de vidrio. Si el ADN va a ser hibridado, las células se desnaturalizan con calor o un metal alcalino. Las células entonces se ponen en contacto con la solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de las sondas específicas que están marcadas. Las sondas se marcan preferiblemente con radioisótopos o indicadores fluorescentes.

VI. Kits

También se describen en la presente patente partículas de ácido nucleico-lípido en forma de un kit. El kit habitualmente comprenderá un envase que se encuentra dividido en compartimentos para contener los diversos elementos de las partículas de ácido nucleico-lípido y el desestabilizador de la membrana endosomal (*por ejemplo*, iones de calcio). El kit contendrá las composiciones, preferiblemente en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación y administración. En aún otros modos de realización, las partículas y/o composiciones que comprenden las partículas tendrán una fracción para la fijación de la diana unida a la superficie de la partícula. Los métodos para unir fracciones para la fijación de las dianas (*por ejemplo*, anticuerpos, proteínas) a lípidos (tales como los utilizados en las presentes partículas) son conocidos por los expertos en el arte.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada. Los expertos en el arte reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no vitales que pueden cambiarse o modificarse para producir esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Formulaciones de SNALP que encapsulan siARN

Este ejemplo muestra la encapsulación del siARN en la SNALP formulada con PEGDAG de cadena corta o larga, y producido mediante el mezclado continuo de soluciones de lípidos orgánicos y tampón acuoso. Los lípidos PEG-DAG empleados fueron PEG-dimiristilglicerol (C_{14}) (PEG-DMG) y PEG-distearilglicerol (C_{18}) (PEG-DSG). El siARN anti-β-galactosidasa (β-gal) encapsulado en una SNALP de DSPC:Colesterol:DODMA:PEG-DMG/PEG-DSG mediante este método dio como resultado una encapsulación de ≥ 90% (ensayo Ribogreen) y un tamaño de partícula de ∼120 nm (clasificador Malvern). Las preparaciones presentaron las siguientes características:

4 ml prep: siARN anti-B-gal en liposomas de DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG

Mezcla inicial = 94% de encapsulación

Mezcla post dilución = 98% de encapsulación

Mezcla post incubación = 97% de encapsulación

Posterior a diálisis durante la noche = 96% de encapsulación

Tamaño de partícula = 109,7 nm

Polidispersidad = 0,14

8 ml prep: siARN anti-B-gal en liposomas DSPC:Chol:DODMA:PEG-DMG

Mezcla post dilución e incubada = 89%

Posterior a diálisis durante la noche = 91%

Tamaño de partícula = 127,5 nm

Polidispersidad = 0,11

8 ml prep: siARN anti-B-gal en liposomas DSPC: Chol:DODMA:PEG-DSG

Mezcla post dilución e incubada = 90%

Posterior a diálisis durante la noche = 90%

Posterior a filtrado estéril = 90%

Tamaño de partícula = 111,6 nm

Polidispersidad = 0,24

Ejemplo 2. Regulación por disminución de la expresión intracelular en células mediante la administración *in vitro* de una formulación de SNALP que encapsulan siARN.

Este ejemplo muestra la regulación por disminución de la expresión de la β-Gal en células CT26.CL25 a las que se administró *in vitro* liposomas de DSPC:Colesterol:DODMA:PEG-DMG que encapsulan siARN anti-β-Gal. Los resultados se representan en la Figura 1.

La administración *in vitro* de 0,2 µg de siARN anti-β-Gal encapsulado en Oligofectamina disminuyó la actividad de la β-Gal en aproximadamente un 60% en comparación con las células de control no expuestas. La encapsulación de 1,5 µg siARN anti-β-Gal en liposomas de DSPC:Colesterol:DODMA:PEG-DMG disminuyó la actividad de la β-Gal en aproximadamente un 30% en comparación con las células de control no expuestas.

Ejemplo 3. Ensayos para la estabilidad en suero

Las partículas de ácido nucleico/lípidos formuladas de acuerdo a las técnicas señaladas anteriormente pueden ser sometidas a ensayo para determinar su estabilidad en suero mediante una variedad de métodos.

Por ejemplo, en la digestión habitual de una ADNasa 1, se incuba 1 µg de ADN encapsulado en la partícula de interés en un volumen total de 100 µL de 5 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 10,0 mM de $MgCl_2$ pH 7,4. Las muestras tratadas con ADNasa se trataron o bien con 100 o 10 U de ADNasa I (Gibco - BRL). Puede añadirse Triton X-100 al 1,0% en los experimentos de control para asegurar que las formulaciones de lípidos no van a desactivar la enzima directamente. Las muestras se incuban a 37°C durante 30 min, donde después de este tiempo el ADN es aislado mediante la adición de 500 µL de DNAZOL seguido de 1,0 mL de etanol. Las muestras se centrifugan durante 30 min a 15.000 rpm en una microcentrifugadora de sobremesa. El sobrenadante se decanta y el granulado de ADN resultante se lava dos veces con etano al 80% y se seca. Este ADN es resuspendido en 30 µL de tampón TE. 20 µL de esta muestra se carga en un 1,0% de gel de agarosa y se somete a electroforesis en tampón TAE.

En un ensayo habitual de suero, 50 µg de ADN se alícuota en Triton X100 libre, encapsulado, o encapsulado + 0,5%, en tubos Eppendorf de 1,5 mL. A los tubos se añadió 45 µl de suero fisiológico murino o humano, dH2O (para hacer un volumen final de 50 µL). Los tubos se sellaron con película parafilm y se incubaron a 37°C. Una muestra de Triton X100 libre, encapsulado, o encapsulado +0,5% no digerido por la nucleasa (estándar), se congeló en nitrógeno líquido en un tubo Eppendorf y se almacenó a -20°C. Los alícuotas se tomaron en diversos puntos de tiempo, se añadieron al tampón GDP que contenía proteinasa K (133 µg/mL) y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido para detener la reacción. Una vez que todos los puntos de tiempo se recogieron, las muestras se incubaron a 55ºC en un baño de agua para activar la proteinasa K permitiendo que desnaturalizara cualquier exonucleasa restante. Las muestras de Proteinasa K digeridas se aplicaron a geles de poliacrilamida para evaluar los niveles de degradación por exonucleasa.

Las partículas reveladas anteriormente muestran una estabilidad en suero, mostrando cantidades de degradación del ADN (parcial o total) de menos del 5% y preferiblemente indetectables como resultado de un tratamiento de este tipo, incluso en presencia de 100 U de ADNasa 1. Este resultado se compara favorablemente con el ADN libre, que se degrada completamente, y los complejos plásmido/lípidos (tales como los complejos de DOTMA o DODAC:DOPE), en donde el ADN se degrada sustancialmente (*es decir*, más de un 20%, a menudo un 80%) después de dicho tratamiento.

Ejemplo 4. Caracterización de las SNALPs

Este ejemplo describe la fijación como diana del sitio con la enfermedad y la expresión de genes que es el resultado de la administración por vía intravenosa de SNALP en ratones portadores de tumores. En este ejemplo, el ácido nucleico encapsulado es un plásmido.

El método de SNALP tuvo como resultado la encapsulación del plásmido de ADN en “partículas de ácido nucleico-lípido estabilizadas” (SNALP) pequeñas (diámetro ~70 nm). Las SNALP consisten en un plásmido por partícula,

encapsulado dentro de una bicapa lipídica estabilizada por la presencia de un componente estabilizador bicapa, tal como un recubrimiento de poli(etilenglicol) (PEG). Las SNALP mostraron tiempos de vida en circulación prolongados a continuación de la administración por vía intravenosa y promovieron la administración del plásmido intacto a los sitios con tumor distales, lo que tiene como resultado la expresión de genes indicadores en el sitio con la enfermedad.

Las SNALP con tiempos en circulación largos acumulados en niveles correspondientes a un cinco por ciento al 10 por ciento de la dosis total inyectada por gramo de tumor o mayor que 1000 copias de ADN plasmídico por célula, dando lugar a niveles de expresión de genes que fueron más de dos órdenes de magnitud mayores que las observadas en cualquier otro tejido. De forma interesante, aunque el hígado acumuló un 20-30% de la dosis total inyectada, se observaron niveles muy bajos de expresión de genes en el hígado. Se cree que este hecho responde a la limitada captación hepatocelular de la SNALP PEG-ilada SNALP. *Ver*, Figuras 7-9.

La administración y la transfección *in vivo* potencial de partículas de ácido nucleico-lípido que contienen un componente estabilizador bicapa, se mejoró adicionalmente mediante la incorporación de un PEG-lípido catiónico (CPL) que consiste en un anclaje con DSPE, cadena espaciadora de PEG_{3400} y un grupo de cabeza catiónico. Cuando se incorporaron los CPL en las SNALP a concentraciones de 2 a 4 mol%, los resultantes CPL-SNALP eran de un tamaño y estabilidad similar a la de las SNALP nativas. La incorporación de CPL tuvo como resultado un incremento dramático de la administración intracelular y un incremento concomitante en la actividad de transfección medida tanto *in vitro* como *in vivo*. De manera específica, el CPL-SNALP produjo 10^5-veces más expresión de genes *in vitro* que la SNALP nativa. Cuando se administró el CPL-SNALP por vía intravenosa produjeron un incremento sustancial (250 veces) en la expresión de genes hepáticos en comparación con la SNALP nativa. El incremento de la potencia de CPL-SNALP fue específico para el hígado. Los niveles de la expresión de genes medidos en el pulmón, riñón, bazo o corazón permanecieron inalterados, lo que contribuye a un diferencial de magnitud de más de dos órdenes en la expresión de genes medida en el hígado versus otros órganos.

Estos resultados ilustran el potencial para modular las propiedades de administración de los sistemas que contienen PEG-lípidos, a la vez que mantienen la estabilidad y el tamaño pequeño uniforme requerido para lograr la administración sistémica. En particular, demuestran que la fijación de diana del sitio y la expresión de genes específica puede ser reprogramada alterando la composición de lípidos de los sistemas de administración de genes no virales.

Ejemplo de referencia 5: SNALP que contienen conjugados de PEG-DAG

Este ejemplo muestra la preparación de una serie de SNALP de lípidos PEG-diacilglicerol (PEG-DAG). En este ejemplo, el ácido nucleico encapsulado es un plásmido.

Las SNALP de PEG-DAG se prepararon incorporando 10 mol en tanto por ciento de PEG-dilaurilglicerol (C_{12}), PEG-dimiristilglicerol (C_{14}), PEG-dipalmitoilglicerol (C_{16}) o PEG-diesterilglicerol (C_{18}) y se evaluó para determinar la actividad de transfección *in vitro*, la farmacocinética y la biodistribución de la expresión de genes que es resultado de la administración sistémica en ratones portadores de tumores. La SNALP que contiene un lípido PEG-DAG demostró una relación similar entre la longitud de la cadena de acilo y la actividad de transfección *in vitro* que los que contienen PEG-ceramidas. Los anclajes de cadenas de acilo más cortas (dimiristil (C_{14}) y dipalmitoil (C_{16})) tuvo como resultado partículas SNALP que fueron menos estables pero tienen mayor actividad de transfección *in vitro* que las que incorporan anclajes de cadenas acilo más largas (disterilo (C_{18})). La evaluación de la farmacocinética de SNALP que contienen PEG-DAG confirmó una correlación entre la estabilidad del componente lipídico PEG y el tiempo de vida en circulación de la SNALP. Las SNALP que contenían PEG-dimiristilglicerol (C_{14}), PEG-dipalmitoilglicerol (C_{16}) y PEG-disterilglicerol (C_{18}) demostraron vidas medias en la circulación de 0,75, 7 y 15 horas respectivamente. Una vida en la circulación prolongada, a su vez, se correlaciona con un incremento en su administración al tumor y con la expresión de genes concomitante.

Después de la administración por vía intravenosa, las SNALP que contienen PEG-disterilglicerol (C_{18}) evitan los llamados órganos de “primer paso”, incluyendo el pulmón, y provocan la expresión de genes en el tejido tumoral distal. El nivel de expresión del gen indicador observado en los tumores representa un diferencial de 100 a1000 veces sobre el observado en cualquier otro tejido. Esto es comparable con el comportamiento de las SNALP que contienen PEG-ceramida C_{20}. La incorporación del PEG-DAG en la SNALP confirmó que un tamaño pequeño, una carga de superficie baja y tiempos de vida en la circulación prolongados son requisito previo al establecimiento como diana del sitio con la enfermedad pasivo (targeting pasivo) lo que conduce a una acumulación de ADN plasmídico y expresión de genes en tumores después de la administración sistémica de sistemas de transfección no virales. Ver las Figuras 3-9.

Materiales y métodos

Materiales

Se obtuvieron DOPE y DSPC de Northern Lipids (Vancouver, BC). DODAC y los PEG-diacilgliceroles fueron elaborados por Inex Pharmaceuticals (Burnaby, BC). Los otros materiales, HEPES, OGP y ^{3}H-colesteril-hexadecil-éter, se obtuvieron de una variedad de diferentes fuentes comerciales.

Se prepararon vesículas unilamelares grandes de DOPE:DODAC:PEG-Diacilgliceroles (82,5:7,5:10) mediante diálisis con detergente en suero salino tamponado con Hepes (150 mM de NaCl y 10 mM de HEPES) durante 48 horas. Se prepararon las soluciones madre de lípidos en etanol y después se secaron para crear una película lipídica que se reconstituyó en una cantidad final de 200mM OGP. Se marcaron los LUV con ^{3}H-colesteril hexadecil éter a 1uCi/1mg lípido. Los tamaños de partículas se determinaron mediante análisis de distribución Nicomp. La radiactividad se determinó mediante conteo de centelleo con Picofluor20.

Se formularon SNALP que contienen PEG-Diacigliceroles mediante diálisis con detergente variando la concentración de sal para maximizar el porcentaje de encapsulación de ADN. Se eligió la concentración de sal óptima para la diálisis con detergente de 48 horas. Se retiraron las vesículas vacías por centrifugación de sacarosa de una etapa. Se utilizó un 3,5% de sacarosa para separar las partículas vacías de las formulaciones de PEG-Diacilglicerol que contiene plásmido, excepto para las SNALP que contienen PEG-Dimiristilglicerol para las que se utilizó un 5,0% de sacarosa. Las vesículas vacías migraron a la parte superior del tubo, las cuales fueron fraccionadas y eliminadas.

Transfección in vitro

Se colocaron 5 x 10^{4} células en placas de 24 pocillos (1 ml). Las células se dejaron crecer durante 24 horas. Se añadieron 500 µl de medio de transfección (2,5µg/pocillo) y a continuación se incubaron durante puntos de tiempo indicados. El medio de transfección se aspiró después del punto de tiempo y se expuso a continuación al medio completo durante otras 24 horas a 37°C en CO_2 al 5,0%. El medio completo se eliminó. Las células se lavaron con PBS dos veces y se almacenaron a -70°C hasta el día del experimento. Las células fueron lisadas con 150 µl de 1x CCLR que contenía inhibidores de proteasa. Las placas se agitaron durante 5 minutos. Se sometió a ensayo por duplicado 20 µl de cada muestra en una placa de luminiscencia de 96 pocillos para determinar la actividad de la luciferasa.

Farmacocinética, Biodistribución, y Expresión de genes in vivo

La farmacocinética y biodistribución se determinaron normalizando los datos a la cantidad de radiactividad presente. Aproximadamente 500 µl de sangre se obtuvieron mediante punción cardíaca. Se separaron glóbulos rojos y plasma mediante centrifugación (4°C, 3000 rpm, 10 minutos) y se utilizaron 100 µl de plasma para determinar los conteos radiactivos. Los órganos se cosecharon en tiempos específicos y se homogeneizaron en tubos con matriz de lisis (Fast Prep, 2 x 15 segundos, 4,5 intensidad) para someter a ensayo una parte de la mezcla.

La expresión de genes se determinó mediante ensayo con luciferasa. Los órganos fueron cosechados, homogeneizados, y se mantuvieron en hielo durante todo el experimento. Los lisados se centrifugaron (10.000 rpm, 5 minutos) y se sometieron a ensayo 20 µl de sobrenadante por duplicado en una placa de luminiscencia de 96 pocillos para determinar la actividad de la luciferasa. Los resultados se representan en las Figuras 6-9.

Silenciamiento de genes in vitro

Se transfectaron células con SPLP que comprendía conjugados de PEG-lípidos y que contenían un plásmido que codifica la luciferasa bajo el control del promotor de CMV y las SNALP que contienen siARN anti-luciferasa, según los métodos descritos anteriormente. La expresión de genes se determinó mediante ensayo con luciferasa. Los resultados se representan en la Figura 17.

Ejemplo de referencia 6: Expresión de ácidos nucleicos encapsulados en SPLP que comprende conjugados de PEG-dialquiloxipropilo

Estos ejemplos describen experimentos que comparan la expresión de ácidos nucleicos encapsulados en SPLP que comprende conjugados de PEG-dialquiloxipropilo. Todas las formulaciones de SPLP comprenden un plásmido que codifica la luciferasa bajo el control del promotor de CMV (pLO55).

Grupo	# de ratones	Tumor	Vía	Tratamiento	Vía	# de dosis	Punto de tiempo	ENSAYO***
A	4	Neuro-2a	SC	PBS	IV	1	48 horas	Pesos corporales, análisis de sangre, actividad de luciferasa
B	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-DSG	IV	1	48 horas	

C	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-A-DSA	IV	1	48 horas	Pesos corporales, análisis de sangre, actividad de luciferasa
D	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-A-DPA	IV	1	48 horas	
E	5	Neuro-2a	SC	SPLP PEG-A-DMA	IV	1	48 horas	

Los lípidos (DSPC:CHOL:DODMA:PEG-Lípido) estaban presentes en las SPLP en las siguientes relaciones molares (20:55:15:10). Se realizaron las siguientes formulaciones:

A: PBS filtrado estéril, 5 mL.

B: pL055-SPLP con PEG-DSG, 2 mL a 0,50 mg/mL.

C: pL055-SPLP con PEG-A-DSA, 2 mL a 0,50 mg/mL.

D: pL055-SPLP con PEG-A-DPA, 2 mL a 0,50 mg/mL.

E: pL055-SPLP con PEG-A-DMA, 2 mL a 0,50 mg/mL.

Grupo	# de ratones	Fecha de sembrado	Tratamiento	Fecha de inyección	Fecha de recolección
A	4	Día 0	PBS	Día 12	Día 14
B	5	Día 0	SPLP PEG-DSG	Día 12	Día 14
C	5	Día 0	SPLP PEG-A-DSA	Día 12	Día 14
D	5	Día 0	SPLP PEG-A-DPA	Día 12	Día 14
E	5	Día 0	SPLP PEG-A-DMA	Día 12	Día 14

Se administraron $1{,}5x10^6$ de células Neuro2A a cada ratón en el día 0. Cuando los tumores tuvieron un tamaño adecuado (200 - 400 mm^3), los ratones se distribuyeron aleatoriamente y se trataron con una dosis de una formulación de SPLP o PBS por inyección intravenosa (IV). Las cantidades se basan en las mediciones del peso corporal tomadas en el día de la dosificación. 48 horas después de la administración de la SPLP, los ratones fueron sacrificados, su sangre se recogió, y los siguientes tejidos se recogieron, se pesaron, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80C hasta su análisis en mayor detalle: tumor, hígado (cortado en 2 mitades), pulmones, bazo y corazón.

La expresión de genes en los tejidos recogidos se determinó realizando un ensayo para determinar la actividad enzimática de la proteína indicadora de la luciferasa expresada. Los resultados se muestran en las Figuras 11 y 12.

Los resultados indican que la SPLP que comprende PEG-dialquiloxipropilos (*es decir*, PEG-DAA) puede ser utilizada convenientemente para transfectar el tumor distal hasta sustancialmente el mismo grado que la SPLP que comprende PEG-diacilgliceroles. Más aún, los niveles de transfección observados con la SPLP que contiene PEG-dialquiloxipropilo son similares a los observados con la SPLP que contiene PEGdiacilgliceroles (*por ejemplo*, PEG-DSG). También se mostró que al igual que el sistema con PEG-diacilglicerol, ocurrió muy poca transfección en tejidos no tumorales. Más aún, las SLPL que comprenden PEG-dialquiloxipropilos muestran toxicidad reducida en comparación con otras formulaciones de SPLP.

Ejemplo 7. SNALP que contienen conjugados de PEG-dialquiloxipropilo

Este ejemplo describe experimentos que analizan la biodistribución (local y sistémica) y la farmacocinética de una serie de SNALP con lípidos PEG-dialquiloxipropilo (*es decir*, SPLP que contienen siARN encapsulado).

Biodistribución local

Para determinar la distribución local de las SPLP que son el resultado de la administración sistémica del siARN anti-β galactosidasa en ratones portadores de neuroblastoma Neuro-2a mediante microscopía de fluorescencia.

A: PBS

B: SNALP de DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA con siARN anti-βgal-marcado con Rodamina-PE (1:20:54:15:10)

Grupo	Ratones	Células	Tratamiento	Punto de tiempo	Ensayo
A	2	Neuro-2a	PBS	24 horas	Fotomicroscopía fluorescente
B	5	Neuro-2a	DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA con siARN anti-Bgal marcado con Rodamina-PE	24 horas	Fotomicroscopía fluorescente

Se administraron $1,5x10^6$ de células Neuro2A a cada ratón en el día 0. Cuando los tumores tuvieron un tamaño adecuado (200 - 400 mm^3, habitualmente día 9-12)), se distribuyeron los ratones de forma aleatoria y se trataron con una dosis de una formulación de SNALP que comprende 100 µg siARN o PBS por inyección intravenosa (IV) en un volumen total de 230 µl. Las cantidades de las dosis están basadas en las mediciones del peso corporal tomadas el día de la dosificación. Los ratones fueron sacrificados 24 horas después de la administración de las SPLP, se recogió su sangre, y los siguientes tejidos se recogieron, se pesaron, se congelaron inmediatamente y se almacenaron a -80C hasta su análisis en más detalle: tumor, hígado (cortado en 2 mitades), pulmones, bazo y corazón.

La distribución local de las SNALP se determinó mediante microscopía de fluorescencia. Se observa acumulación de SNALP, por ejemplo, en el hígado, lo que demuestra que las SNALP que comprenden PEG-dialquiloxipropilos son capaces de extravasar, *es decir*, salir de la circulación y dirigirse a un tejido u órgano diana.

Farmacocinética y Biodistribución sistémica

Este ejemplo ilustra la farmacocinética y biodistribución de las SPLP que contienen un plásmido que codifica la luciferasa bajo el control del promotor de CMV (LO55) y SNALP que contienen siARN anti-luciferasa en ratones a los que se ha implantado neuroblastoma Neuro2A por vía subcutánea.

Grupo	Ratones	Células	Tratamiento	Punto de tiempo (h)
A	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	0,25, 1, 4, 8, 24
B	6	Neuro2A	[3-H]CHE-anti-luc siARN-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	0,25, 1, 4, 8, 24
C	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA	0,25, 1, 4, 8, 24
D	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055-pSPLP (PEI)	0,25, 1, 4, 8, 24
E	6	Neuro2A	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG	0,25, 1, 4, 8, 24

Todas las muestras han de proporcionarse a razón de 0,5 mg/ml de ácido nucleico. Se prepararon las siguientes formulaciones de SPLP y SNALP:

A. [^{3}H] CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA (20:55:15:10)

B. [^{3}H] CHE-anti-luc siARN-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA (20:55:15:10)

C. [^{3}H] CHE-L055 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA (20:55:15:10)

D. [^{3}H] CHE-L055-pSPLP (PEI) (*es decir*, SPLP precondensadas)

E. [^{3}H] CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG (20:55:15:10)

Grupo	# de ratones	Fecha de sembrado	Tratamiento	Fecha de inyección	Fecha de recolección
A	6	Día 0	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-A-DMA	Día 12	31 de Julio

B	6	Día 0	[3-H]CHE-anti-luc siARN-DSPC:Chol:DODMA:PEG-ADMA	Día 12	31 de Julio
C	6	Día 0	[3-H]CHE-L055 -DSPC:Chol:DODMA:PEG-C-DMA	Día 13	Día 14
D	6	Día 0	[3-H]CHE-L055-pSPLP (PEI)	Día 13	Día 14
E	6	Día 0	[3-H]CHE-L055-DSPC:Chol:DODMA:PEG-DSG	Día 14	Día 15

En 30 ratones A/J machos (Jackson Laboratories) se implantaron por vía subcutánea células de neuroblastoma Neuro 2A en una dosis de 1,5 x 10^6 células en un volumen total de 50 µL de solución tampón de fosfatos en el día cero. Después de que los tumores alcanzaran un tamaño adecuado (habitualmente en el día 9 o más tarde), se administraron por vía intravenosa 200 µl (100 µg de ácido nucleico) de las preparaciones de las SPLP o SNALP descritas anteriormente. 0,25, 1, 2, 4, y 8 horas después de la administración de las SPLP o SNALP, los ratones se pesaron y se recogió sangre (generalmente 25 µL) mediante un corte en la cola. 24 horas después de la administración de las SPLP o SNALP, los ratones se sacrificaron, se recogió sangre y se sometió a ensayo para determinar el aclaramiento de [^{3}H]CHE. Los órganos (*por ejemplo*, hígado, pulmón, bazo, riñón, corazón) y los tumores se recogieron y evaluaron para determinar la acumulación de [^{3}H]CHE. Los resultados se muestran en las Figuras 13-16.

Para todas las formulaciones, las SPLP que contienen PEG-DSG permanecieron en la circulación durante más tiempo, permaneciendo el 50% de la dosis inyectada durante 6 h. De forma interesante, parece haber un aclaramiento rápido inicial de la pSPLP en los primeros 15 minutos que no se observó para ninguna otra formulación. Después de 1h el perfil de aclaramiento de las pSPLP era bastante similar al de SPLP. Este aclaramiento rápido inicial para la muestra de pSPLP puede indicar que existen realmente dos tipos de partículas presentes, una que se elimina muy rápidamente y una que se comporta de forma muy parecida a la SPLP.

Las vesículas que contienen siARN anti-Luc (SNALP) formuladas con el PEG-A-DMA C14 mostraron un aclaramiento más rápido de la sangre que las SPLP que contiene el PEG-DSG C 18. Sin embargo, esta formulación de SNALP mostró un aclaramiento de la sangre significativamente más lento que las SPLP formuladas con el mismo lípido PEG. Una posible razón para este resultado puede ser que las partículas que contienen siARN pueden evadir el sistema inmune celular más fácilmente que las SPLP que contienen plásmido.

Las SPLP que comprenden PEG-C-DMA demostraron un rápido aclaramiento de la sangre, que era sustancialmente el mismo que el observado para las SPLP que comprenden PEG-A-DMA. Para ambas de estas formulaciones, la vida media en plasma fue aproximadamente 2 h, menos que para las SPLP que contienen PEG-lípidos C18.

Las SPLP que contienen PEG-DSG presentaron la mayor acumulación tumoral en un 10,9% de la dosis inyectada por gramo de tejido. Las dos formulaciones de SPLP que contienen PEG-lípidos C14, PEG-A-DMA y PEG-C-DMA, presentaron la inferior acumulación tumoral de un 6,1% y un 5,9% de la dosis inyectada por gramo de tejido. La SNALP con siARN presentó ligeramente más acumulación tumoral que una muestra de SPLP con el mismo PEG-lípido de un 7,3%, lo que también se correlaciona relativamente bien con la vida media en plasma para esta SNALP. La formulación de pSPLP presentó una acumulación tumoral de un 7,5%, que es inferior a la de PEG-DSG SPLP comparable.

La acumulación de SPLP y pSPLP que contienen PEG-DSG, en el corazón y los pulmones fue más elevada que la de las otras SPLP y SNALP, lo cual es consistente con el aumento en la vida media en circulación de las partículas con PEG-lípidos C18. No de forma sorprendente, se observó una relación inversa entre la vida media en plasma y la acumulación en el hígado para todas las muestras analizadas, mientras que no se observó una tendencia clara para la acumulación de la muestra en el bazo. La acumulación en los riñones fue muy lenta para todas las formulaciones de ensayo, con una acumulación de entre un 1,2 y 2,4% de dosis inyectada por gramo de tejido.

Ejemplo de referencia 8: Silenciamiento de la expresión de genes con las SNALPs

Este ejemplo ilustra el silenciamiento de la expresión de genes en ratones portadores de neuroblastoma Neuro 2A después de la co-administración de SPLP que contienen un plásmido que codifica luciferasa bajo el control del promotor de CMV y SNALP que contienen siARN antiluciferasa.

Grupo	**# de ratones**	**Tumor**	**Vía**	**Tratamiento**	**Punto de tiempo**	**Vía**	**# de dosis**

1	3	Neuro-2a	SQ	PBS / PBS	48 h	IV	1
24A	4			Mezcla de L055-SPLP / PBS	24 h		
24B	4			Mezcla de L055-SPLP / Liposomas de siARN anti-luc			
48A	4			Mezcla de L055-SPLP / PBS	48 h		
48B	4			Mezcla de L055-SPLP / liposomas de siARN anti-luc			
72A	4			Mezcla de L055-SPLP / PBS	72 h		
72B	4			Mezcla de L055-SPLP / liposomas de siARN anti-luc			

Grupo	**# de ratones**	**Fecha de sembrado**	**Vía**	**Tratamiento IV**	**Punto de tiempo**	**Fecha de inyección**	**Fecha de recolección**
1	3	Día 0	SQ	PBS / PBS	48 h	Día 13	Día 15
24A	4			Mezcla de L055-SPLP / PBS	24 h	Día 14	
24B	4			Mezcla de L055-SPLP / Liposomas de siARN anti-luc		Día 14	
48A	4			Mezcla de L055-SPLP / PBS	48 h	Día 13	
48B	4			Mezcla de L055-SPLP / liposomas de siARN anti-luc		Día 13	
72A	4			Mezcla de L055-SPLP / PBS	72	Día 12	
72B	4			Mezcla de L055-SPLP / liposomas de siARN anti-luc		Día 12	

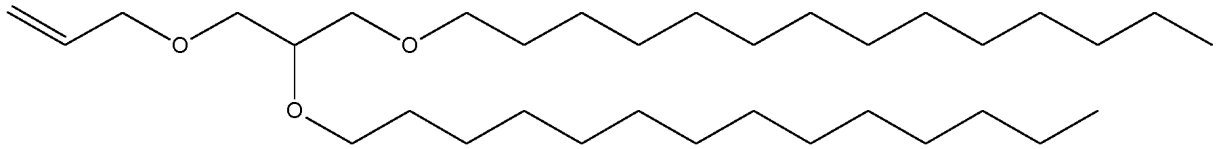
Se implantaron a 36 ratones A/J machos (Jackson Laboratories) por vía subcutánea células de Neuro 2A en una dosis de 1,5 x 10^6 células en un volumen total de 50 µL de solución tampón de fosfatos en el día cero. Una vez que los tumores alcanzaron el tamaño adecuado (habitualmente en el día 9 o más tarde), formulaciones de 200-240 µl de PBS, SPLP, o SNALP (100 µg de ácido nucleico total), preparados según se describe en el Ejemplo 6 anterior, se administraron por vía intravenosa. 24, 48, o 72 horas después de la administración de PBS, SPLP o una mezcla de SPLP y SNALP, los ratones se sacrificaron y los órganos (*por ejemplo*, hígado, pulmón, bazo, riñón, corazón) y se recogieron los tumores y se evaluaron para determinar la actividad de la luciferasa. Los resultados se muestran en las Figuras 18-22.

Los resultados demuestran que la administración conjunta de SPLP pL055 y SNALP con siARN anti-luc (ambos con PEG-A-DMA en su contenido), disminuye al máximo la expresión del gen luciferasa en un 40% cuarenta y ocho horas después de una única dosis IV.

Ejemplo 9. Síntesis de PEG-Dialquiloxipropilos (PEG-DAA)

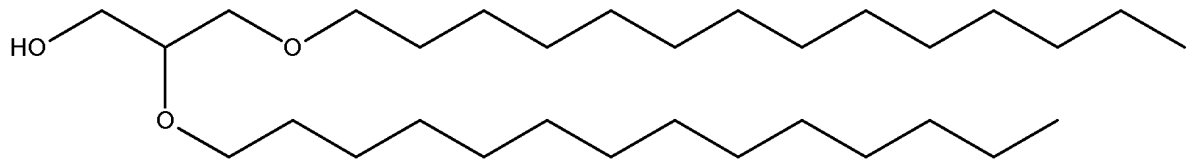
El siguiente ejemplo ilustra la síntesis de tres PEG-lípidos, PEG-A-DMA (7), PEG-C-DMA (**8**), y PEG-S-DMA (**9**). Tienen un precursor común, la lipoamina 1,2-dimiristiloxipropilamina (5). Este lípido tiene cadenas alquilo de 14 unidades de carbono (C_{14}) de longitud. Pueden sintetizarse otras PEG DAA adecuadas para su uso en la presente invención utilizando protocolos similares. Por ejemplo, PEG-A-DSA y PEG-C-DSA pueden ser sintetizados utilizando el análogo C_{18} de (**5**). El análogo C_{18} puede sintetizarse simplemente sustituyendo una cantidad equimolar de bromuro de estearilo por bromuro de miristilo en la primera etapa (síntesis del compuesto (**1**)).

1. Preparación de 1,2-Dimiristiloxi-3-aliloxipropano (1)



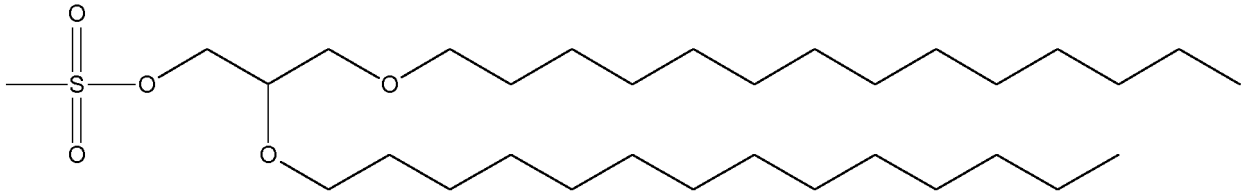
Se añadió benceno (250 ml) a hidruro sódico al 95% (11,4 g, 450,0 mmol), y el matraz se lavó con nitrógeno y se selló. Se añadió una solución de 3-aliloxi-1,2-propanodiol (6,6 g, 50,0 mmol) en benceno (75 ml) al matraz. Utilizando una jeringuilla, 1-bromotetradecano al 97% (36,7 ml, 120,0 mmol) se añadió al matraz y la reacción se dejó a reflujo durante la noche bajo un flujo constante de nitrógeno. Una vez enfriado a temperatura ambiente, el exceso de hidruro sódico se extinguió lentamente con etanol hasta que no se observó más efervescencia. La solución se transfirió a un embudo de decantación con benceno (250 ml) y se lavó con agua destilada (3 x 200 ml). La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y el disolvente se eliminó en el evaporador rotatorio para producir un aceite incoloro. La TLC (éter-hexano al 5%, desarrollado en Molibdato) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (1-5% éter-hexano) para producir 15,0 g (57,3%) de 1,2-dimiristiloxi-3-aliloxipropano **1**.

2. Preparación de 1,2-Dimiristiloxipropan-3-ol (2)



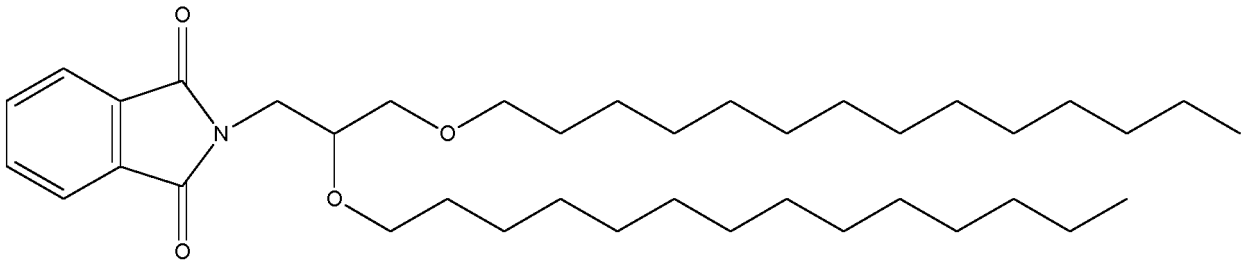
Se disolvió 1,2-Dimiristiloxi-3-aliloxipropano **1** (15,0 g, 28,6 mmol) en etanol (250 ml). Se añadió ácido trifluoroacético (20 ml), seguido de tetrakis(trifenilfosfina)paladio(0) (4,5 g, 3,9 mmol). Se envolvió el matraz en una lámina de estaño y se lavó con nitrógeno para reducir la exposición a la luz y al aire, a continuación se dejó en agitación a 80°C durante la noche. El etanol se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC ($CHCl_3$ al 100%, desarrollado en Molibdato) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (100% DCM) para producir 11,5 g (83,1%) de 1,2-dimiristiloxipropan-3-ol **2**.

3. Preparación de O-(2,3-Dimiristiloxipropil)metanosulfonato (3)



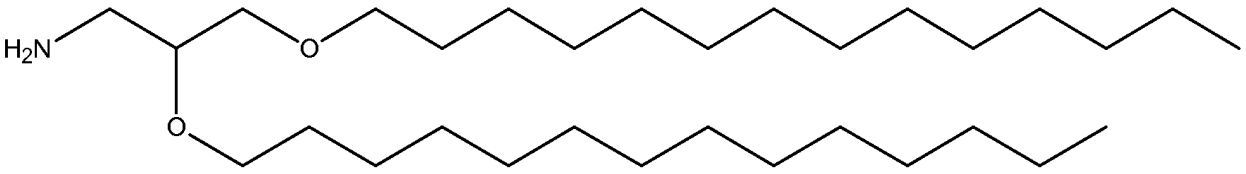
Un matraz que contenía anhídrido metanosulfónico al 97% (8,4 g, 48,0 mmol) se lavó con nitrógeno y se disolvió en diclorometano anhidro (50 ml). Piridina anhidra (3,9 ml, 48,0 mmol) se añadió lentamente, fomrando un precipitado de color blanco. Se añadió una solución de 1,2-dimiristiloxipropan-3-ol **15** (11,5 g, 24,0 mmol) en diclorometano anhidro (100 ml) y la reacción se dejó en agitación durante la noche a temperatura ambiente. La solución se transfirió a un embudo de decantación con diclorometano (100 ml) y se lavó con agua destilada (3 x 100 ml). Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con diclorometano (100 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio y el diclorometano se eliminó en el evaporador rotatorio para producir un aceite incoloro. La TLC ($CHCl_3$ al100%, desarrollado en Molibdato) indicó que todo el material de partida había reaccionado para formar un producto. Esta reacción produjo 11,9 g de *O*-(2,3-dimiristiloxipropil)metanosulfonato crudo **3**.

4. Preparación de N-(2,3-Dimiristiloxipropil)ftalimida (4)



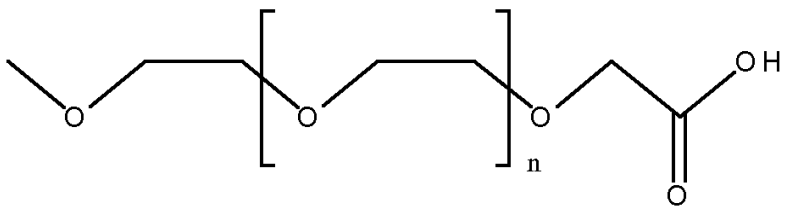
Se lavó el *O*-(2,3-dimiristiloxipropil)metanosulfonato **3** (14,2 g, 25,3 mmol) y potasio ftalimida (13,9 g, 75,0 mmol) con nitrógeno y se disolvieron en *N,N*-dimetilformamida anhidra (250 ml). La reacción se dejó en agitación a 70°C durante la noche bajo un flujo constante de nitrógeno. La *N,N*-dimetilformamida se eliminó en el evaporador rotatorio utilizando una bomba de alto vacío en lugar del habitual aspirador. El residuo se disolvió en cloroformo (300 ml) y se transfirió a un embudo de decantación con un enjuague de cloroformo (50 ml), a continuación se lavó con agua destilada y etanol (3 x 300 ml de agua destilada, 50 ml de etanol). Los lavados acuosos combinados se volvieron a extraer con cloroformo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas se secaron con sulfato de magnesio y el cloroformo se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC (éter-hexano al 30%, desarrollado en Molibdato) indicó que el material de partida había reaccionado para formar un producto. Esta reacción produjo 13,5 g de *N*-(2,3-dimiristiloxipropil)ftalimida **4** cruda.

5. Preparación de 1,2-Dimiristiloxipropilamina (5)



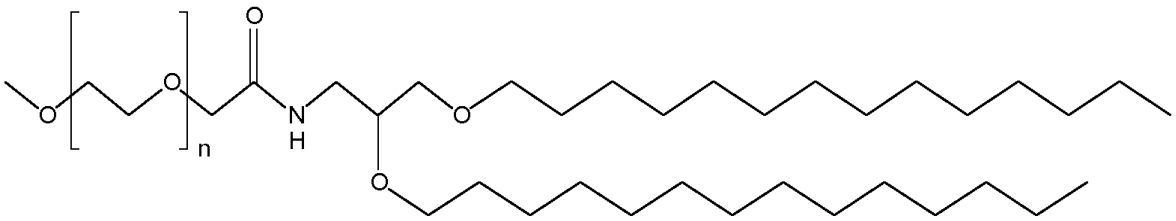
N-(2,3-dimiristiloxipropil)ftalimida **4** cruda (20,0 g, 25,0 mmol) se disolvió en etanol (300 ml). Se añadió monohidrato de hidrazina (20 ml, 412,3 mmol) y la reacción se dejó a reflujo durante la noche. El etanol se eliminó en el evaporador rotatorio y el residuo se redisolvió en cloroformo (200 ml). El precipitado se filtró y el cloroformo se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC (10% MeOH-$CHCl_3$, desarrollado en Molibdato) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-5% MeOH-$CHCl_3$) para producir 10,4 g (89,7% sobre tres etapas de 1,2-dimiristiloxipropan-3-ol 2) de 1,2-dimiristiloxipropilamina **5**.

6. Preparación de ácido metoxi-PEG_{2000} acético (6)



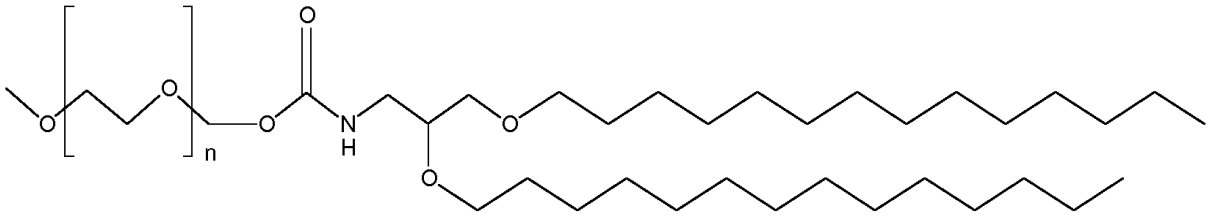
Una solución al 10% de ácido sulfúrico concentrado (20 ml) en agua (180 ml) se añadió dicromato de sodio (3,0 g, 10 mmol). Éter metílico de PEG_{2000} (20,0 g,10 mmol) se disolvió en esta solución de color naranja brillante y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente. El producto se extrajo a continuación con cloroformo (3 x 250 ml) dejando el color azul oscuro en la capa acuosa. El disolvente de cloroformo se eliminó en el evaporador rotatorio, lo que tuvo como resultado una cera de color azul claro. La TLC (13% MeOH-$CHCl_3$, desarrollado en yodo) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este material crudo se purificó a continuación adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-15% MeOH-$CHCl_3$). El producto resultante se cristalizó a continuación en éter para producir 5,6 g (27,1%) de ácido metoxi-PEG_{2000} acético **6** en forma de un sólido de color blanco.

7. Preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) amida PEG_{2000} metil éter (7)



Para la preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) amida PEG_{2000} metil éter (*es decir*, PEG-A-DMA), se disolvió ácido metoxi-PEG_{2000} acético **6** (3,4 g, 1,7 mmol) en benceno (40 ml) y se lavó con nitrógeno. Se añadió lentamente cloruro de oxalilo (1,7 ml, 2,5 g, 20 mmol) mediante una jeringuilla y una aguja a través de un tapón suba seal. Esta reacción se dejó en agitación durante 2 horas, a continuación el benceno se eliminó en el evaporador rotatorio. 2,3-miristililoxipropilamina 5 (0,87 g, 1,8 mmol) se añadió al matraz, seguido de diclorometano anhidro (40ml) y trietilamina (1,5 ml, 10 mmol). La reacción se dejó en agitación durante 48 horas. Se añadió agua destilada (250 ml), la solución se acidificó con ácido clorhídrico (1,5 ml) se agitó, y la capa orgánica se recogió. El producto se extrajo de la capa acuosa con cloroformo (2 x 65 ml). Las capas orgánicas combinadas se secaron con sulfato de magnesio. Se eliminó el cloroformo en el evaporador rotatorio para producir un sólido amarillo. La TLC (MeOH-$CHCl_3$ al 10%, desarrollado en sulfato de cobre y yodo) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. El material crudo se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-7% MeOH-$CHCl_3$). A continuación se descoloró añadiendo carbón vegetal activado (2 g) y etanol (100 ml) y se permitió que la mezcla girara a 55°C en el evaporador rotatorio durante 30 minutos. El carbón vegetal se filtró y el etanol se eliminó en el evaporador rotatorio. El producto fue liofilizado para producir 1,7 g (38,1%) de *N*-(2,3-dimiristiloxipropil)amida PEG_{2000} metil éter 7 en forma de polvo suelto de color blanco.

8. Preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) carbamato PEG_{2000}-metil-éter (8)

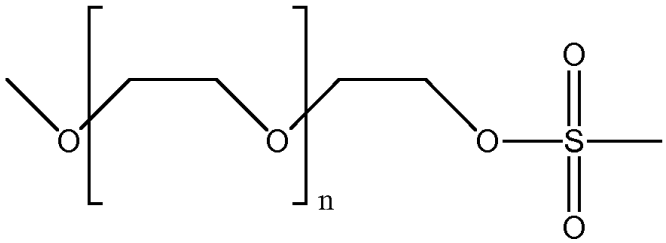


Para la preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) carbamato PEG_{2000} metil éter (*es decir*, PEG-C-DMA), se siguieron las etapas 1-5 descritas anteriormente. A continuación, PEG_{2000} metil éter (2,0 g, 1,0 mmol) se lavó con nitrógeno y se disolvió en diclorometano anhidro (15 ml). Se añadió difosgeno (300 µl, 2,5 mmol) y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 3 horas. El diclorometano se eliminó en el evaporador rotatorio y se eliminó cualquier difosgeno restante utilizando la bomba de alto vacío. El matraz se lavó con nitrógeno y se añadió 2,3-dimiristiloxipropilamina **5** (0,7 g, 1,5 mmol). Esto se disolvió en diclorometano de anhidro (15 ml), se añadió trietilamina (280 ul), y la reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante toda la noche. La solución se transfirió a un embudo de decantación con diclorometano (5 ml) y se lavó con agua destilada (2 x 20 ml). La capa orgánica se secó con sulfato de magnesio y el diclorometano se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC (MeOH-$CHCl_3$ al 3%, desarrollado en Molibdato y yodo) mostró que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (1,5-10% MeOH-$CHCl_3$) para producir 1,2 g (46,5%) de *N*-(2,3-dimiristiloxipropil)carbamato PEG_{2000} metil éter **8**.

9. Preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) succinamida PEG_{2000} metil éter (13)

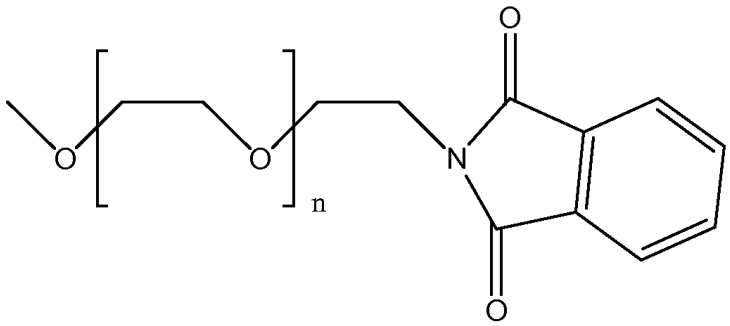
Para la preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) succinamida PEG_{2000} metil éter (13), se siguieron las etapas 1-5 descritas anteriormente. El resto del procedimiento es tal como sigue a continuación.

a. Preparación de PEG_{2000} mesilato (9)



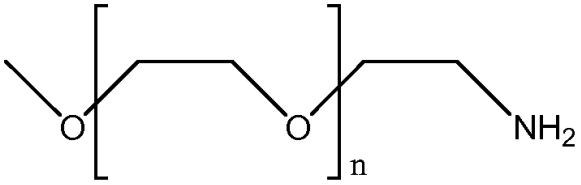
Se disolvió anhídrido de mesilo (8,2 g, 47,1 mmol) en cloroformo anhidro (80 ml). Se añadió piridina (3,8 ml, 47,0 mmol) a la solución y se observó humo mientras se formaba un precipitado de color blanco. Se añadió una solución de PEG_{2000} metil éter (31,5 g, 15,5 mmol) en cloroformo anhidro (70 ml) y la reacción se dejó en agitación durante 3 horas. El precipitado de color blanco que se había formado se filtró y el disolvente de cloroformo se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC (5% MeOH-$CHCl_3$, desarrollado en yodo) indicó que la mayoría del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-10% MeOH-$CHCl_3$) para producir 30,1 g (92,8%) de PEG_{2000} mesilato **9** en forma de un sólido de color blanco.

b. Preparación de PEG_{2000} ftalimida (10)



Se disolvió ftalimida de potasio (11,1 g, 59,7 mmol) en *N,N*-Dimetilformamida anhidra (400 ml). Se añadió al matraz una solución de PEG_{2000} mesilato **9** (35,0 g, 16,7 mmol) en *N,N*-Dimetilformamida anhidra (100 ml) y la reacción se dejó en agitación durante la noche a 75°C. El disolvente de *N,N*-Dimetilformamida se eliminó en el evaporador rotatorio utilizando una bomba de vacío de alto vacío en lugar del aspirador habitual. El producto resultante se disolvió en diclorometano (250 ml) y se lavó con agua destilada (2 x 250 ml) y salmuera (250 ml). El disolventes de diclorometano de las capas orgánicas se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC (7% MeOH-$CHCl_3$, visualizada con luz UV y reactivo de Mary (del inglés "Mary's Reagent")) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto resultante se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-10% MeOH-CH_2Cl_2). El producto fue cristalizado a partir de éter para producir 19,4 g (54,1 %) del PEG_{2000} ftalimida **10**.

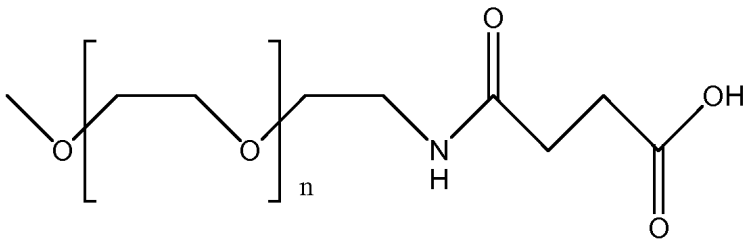
c. Preparación de PEG_{2000} amina (11)



Se disolvió PEG_{2000} ftalimida 10 (10,3g, 4,8 mmol) en etanol (200 ml). Se añadió lentamente monohidrato de hidrazina (6,0 ml, 123,7 mmol) y la reacción se dejó a reflujo a 100°C durante la noche. El precipitado se filtró y el disolvente de etanol se eliminó en el evaporador rotatorio. El producto resultante se disolvió en cloroformo y el sólido restante de color blanco que era insoluble en el cloroformo se filtró y, nuevamente, el cloroformo se eliminó en el evaporador rotatorio. La TLC (10% MeOH-$CHCl_3$, desarrollado en yodo, Molibdato y reactivo de Mary), indicó que

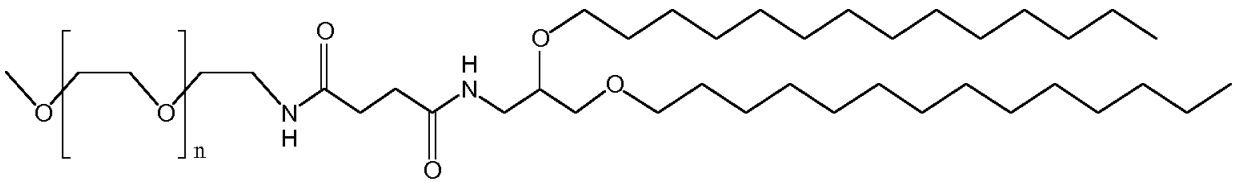
todo el material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto se cristalizó entonces a partir de éter para proporcionar 9,0 g (93,0%) de PEG_{2000} amina **11** en forma de polvo de color blanco.

d. Preparación de PEG_{2000} succinamida (12)



Se disolvió PEG_{2000} amina **11** (9,0 g, 4,4 mmol) y anhídrido succínico (3,8 g, 38,1 mmol) en piridina (100 ml) y la reacción se dejó en agitación durante toda la noche. El disolvente de piridina se eliminó en el evaporador rotatorio a 60°C. El residuo se disolvió en agua destilada (100 ml), se acidificó con ácido clorhídrico, se extrajo con diclorometano (100 ml, 2 x 70 ml), y se secó con sulfato de magnesio. La TLC (10% MeOH-$CHCl_3$, desarrollado en yodo) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. Este producto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-10% MeOH-$CHCl_3$) para proporcionar 5,2 g (55,9%) de PEG_{2000} succinamida **12**.

e. Preparación de N-(2,3-dimiristiloxipropil) succinamida PEG_{2000} metil éter (13)



Se disolvió PEG_{2000} succinamida (2,0 g, 0,9 mmol) y *N*-hidroxisuccinamida (0,2 g, 2,0 mmol) en cloroformo anhidro (10 ml). Después, se añadió una solución de 1,3-Diciclohexil-carbodiimida (0,3 g, 1,5 mmol) en cloroformo anhidro (5 ml), y la reacción se dejó en agitación durante una hora. Se añadió una solución de 1,2-dimiristiloxipropilamina 5 (0,48 g, 1,0 mmol) en cloroformo anhidro (5 ml) y trietilamina (0,6 ml, 4 mmol) y la reacción se dejó en agitación durante una hora. La TLC (12%MeOH-$CHCl_3$, desarrollado en Molibdato) indicó que la mayor parte del material de partida había reaccionado para formar un producto. La solución se filtró a través de Celite con diclorometano, se acidificó con ácido clorhídrico, y se lavó con agua destilada (2 x 50 ml) y salmuera (50 ml). Las capas acuosas se extrajeron nuevamente con diclorometano (50 ml) y las capas orgánicas combinadas se secaron sobre sulfato de magnesio. El producto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna flash (0-7% MeOH-$CHCl_3$) para proporcionar 1,8 g (69,0%) de *N*-(2,3-dimiristiloxipropil) succinamida PEG_{2000} metil éter **13**.

Debe entenderse que la anterior descripción tiene la intención de ser ilustrativa y no restrictiva. Muchos modos de realización serán obvios para los expertos en el arte al leer la anterior descripción.

REIVINDICACIONES

1. Partícula de ácido nucleico-lípido para su uso en la administración *in vivo* de un siARN en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, donde dicho método comprende administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a dicho sujeto mamífero, donde dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende:

un siARN;

un lípido catiónico;

un lípido no catiónico; y

un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido;

en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido.

2. Partícula de ácido nucleico-lípido para su uso según la reivindicación 1, en donde:

(I) dicha partícula tiene un diámetro medio de menos de aproximadamente 150 nm;

(II) dicho siARN comprende aproximadamente de 15 a aproximadamente 60 nucleótidos;

(III) dicho lípido catiónico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en cloruro de N, N-dioleil-N, N- dimetilamonio (DODAC), bromuro de N, N-diestearil-N, N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N- (1- (2, 3-dioleoiloxi)propil)-N,N, N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N- (1- (2, 3-dioleiloxi) propil) -N, N, N-trimetilamonio (DOTMA), y N, N-dimetil-2,3-dioleiloxi) propilamina (DODMA), y combinaciones de los mismos;

(IV) dicho lípido no catiónico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina (EPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, y combinaciones de los mismos;

(V) el conjugado PEG-lípido es un PEG-diacilglicerol, un PEG dialquiloxipropil, un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida, o una combinación de los mismos; o

(VI) el conjugado de PEG-lípido es un conjugado de polietilenglicol (PEG)-dialquiloxipropilo; opcionalmente en donde el conjugado de PEG-dialquiloxipropilo es un PEG-dilauriloxipropilo (C_{12}), un PEG-dimiristiloxipropilo (C_{14}), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C_{16}), o un PEG-distheariloxipropilo (C_{18}), o una combinación de los mismos.

3. Partícula de ácido nucleico-lípido para su uso según la reivindicación 1, en donde:

(I) dicha administración es intravenosa;

(II) dicho mamífero es un humano;

(III) dicho mamífero es un humano que tiene una enfermedad o trastorno asociado con la expresión de un gen que comprende una secuencia diana para dicho siARN, opcionalmente en donde

dicho gen se selecciona del grupo que consiste en un gen asociado con una infección vírica y la supervivencia viral, un gen asociado con una enfermedad o trastorno metabólico, y un gen asociado con la tumorigénesis y la transformación celular, o dicha enfermedad o trastorno está asociada con la sobreexpresión de dicho gen, o en donde dicha enfermedad o trastorno es dislipidemia o una enfermedad vírica tal como la hepatitis; o

(IV) dicho método es para la administración *in vivo* de un siARN, a una célula hepática.

4. Partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

un siARN;

un lípido catiónico;

un lípido no catiónico; y

un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípidos;

en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido,

para su uso en el silenciamiento de la expresión de una secuencia diana en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, donde dicho método

comprende administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a dicho sujeto mamífero en una cantidad terapéuticamente efectiva.

5. Partícula de ácido nucleico-lípido para su uso según la reivindicación 4, en donde:

(I) dicha administración es intravenosa; o

(II) dicho mamífero es un humano; o

(III) dicho mamífero es un humano que tiene una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión de un gen que comprende una secuencia diana para dicho siARN, en donde

dicho gen se selecciona del grupo que consiste en un gen asociado con una infección vírica y la supervivencia viral, un gen asociado con una enfermedad o trastorno metabólico, y un gen asociado con la tumorigénesis y la transformación celular, o dicha enfermedad o trastorno es dislipidemia o una enfermedad vírica tal como hepatitis.

6. Partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

un siARN;

un lípido catiónico;

un lípido no catiónico; y

un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido;

en donde dicha siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido,

para su uso en un método para tratar una enfermedad en un sujeto mamífero, donde dicho método comprende administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a dicho sujeto en una cantidad terapéuticamente efectiva, en donde dicha enfermedad está asociada a la expresión de un gen que comprende una secuencia diana para dicho siARN.

7. Partícula de ácido nucleico-lípido para su uso según la reivindicación 6, en donde:

(I) dicho mamífero es un humano;

(II) dicho gen se selecciona del grupo que consiste en un gen asociado con una infección vírica o la supervivencia viral, un gen asociado con una enfermedad o trastorno metabólico y un gen asociado con la tuorigénesis o la transformación celular;

(III) dicha enfermedad es dislipidemia o una enfermedad vírica tal como hepatitis; o

(IV) dicha administración es intravenosa.

8. Uso de una partícula de ácido nucleico-lípido para la elaboración de una composición para introducir un siARN en una célula en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, en donde dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende:

un siARN;

un lípido catiónico;

un lípido no catiónico; y

un conjugado de polietilenglicol (PEG) -lípido;

en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido.

9. Uso según la reivindicación 8, en donde:

(I) dicha partícula tiene un diámetro de media de menos de aproximadamente 150 nm;

(II) dicho lípido catiónico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en cloruro de N, N-dioleil-N, N-dimetilamonio (DODAC), bromuro de N, N- distearil-N, N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2, 3-dioleoiloxi) propil)- N, N, N-trimetilamonio (DOTAP), cloruro de N- (1- (2, 3-dioleiloxi) propil) -N, N, N-trimetilamonio (DOTMA), y N, N-dimetil-2, 3-dioleiloxi) propilamina (DODMA), y combinaciones de los mismos;

(III) dicho lípido no catiónico es un miembro seleccionado del grupo que consiste en dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), fosfatidilcolina de huevo (EPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), colesterol, y combinaciones de los mismos;

(IV) el conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido es PEG-diacilglicerol, PEG dialquiloxipropilo, PEG-fosfolípido, PEG-ceramida o una combinación de los mismos;

(V) el conjugado de PEG-lípido es un conjugado de polietilenglicol (PEG)-dialquiloxipropilo, opcionalmente en donde el conjugado de PEG-dialquiloxipropilo es PEG-dilauriloxipropilo (C_{12}), PEG-dimiristiloxipropilo (C_{14}), PEG-dipalmitiloxipropilo (C_{16}), o PEG-diestheariloxipropilo (C_{18}); o una combinación de los mismos;

(VI) la presencia de dicha partícula de ácido nucleico-lípido en células diana es detectable al menos 48 horas después de la administración de dicha partícula;

(VII) la presencia de dicha partícula de ácido nucleico-lípido al menos 24 horas después de la administración de dicha partícula; o

(VIII) más del 10% de tales partículas están presentes en el plasma de dicho mamífero 24 horas después de su administración;

la presencia de un siARN en un sitio distal al sitio de administración es detectable durante al menos 48 horas después de la administración de dicha partícula; o

la presencia de un siARN en un stio distal al sitio de administración es detectable durante al menos 24 horas después de la administración de dicha partícula,

opcionalmente, en donde el mamífero es un humano.

10. Uso de una partícula de ácido nucleico-lípido para la elaboración de un medicamento para:

(I) el silenciamiento de la expresión de una secuencia diana en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia,

(II) la administración *in vivo* de un siARN en un método para el tratamiento de un sujeto mamífero mediante terapia, o

(III) tratar una enfermedad en un sujeto mamífero,

en donde dicha partícula de ácido nucleico-lípido comprende:

un siARN;

un lípido catiónico;

un lípido no catiónico; y

un conjugado de polietilenglicol (PEG) -lípido;

en donde dicho siARN se encuentra completamente encapsulado en dicha partícula de ácido nucleico-lípido.

11. Uso según los apartados (I), (II) o (III), de la reivindicación 10, en donde:

(a) dicha partícula de ácido nucleico-lípido se formula para su administración por vía intravenosa;

(b) dicho mamífero es un humano;

(c) dicho mamífero es un humano que tiene una enfermedad o trastorno asociado con la expresión, tal como la sobreexpresión, de un gen que comprende una secuencia diana para dicho siARN,

en donde dicho gen se selecciona del grupo que consiste en un gen asociado con una infección vírica y la supervivencia viral, un gen asociado con una enfermedad o trastorno metabólico y un gen asociado con la tumorigénesis y la transformación celular, o en donde dicha enfermedad o trastorno es dislipidemia o una enfermedad vírica tal como hepatitis; o

(d) dicho uso es formular un medicamento para la administración *in vivo* de un siARN, a una célula hepática.

12. Uso según el apartado (III) de la reivindicación 11, en donde:

- dicha enfermedad es hepatitis; o

- dicho medicamento está adaptado para su administración por vía intravenosa.