

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 498**

51 Int. Cl.:

C12N 15/88	(2006.01)
A61K 31/713	(2006.01)
A61K 9/14	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
C07H 21/00	(2006.01)
C07H 21/02	(2006.01)
C12N 15/113	(2010.01)
C12N 15/87	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2010 PCT/CA2010/001030**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.01.2011 WO2011000107**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2010 E 10793484 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2449114**

54 Título: **Nuevas formulaciones de lípidos para el suministro de agentes terapéuticos a tumores sólidos**

30 Prioridad:

01.07.2009 US 222469 P
14.01.2010 US 295134 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.05.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

YAWORSKI, ED;
REID, STEPHEN;
HEYÉS, JAMES;
JUDGE, ADAM y
MACLACHLAN, IAN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 613 498 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Nuevas formulaciones de lípidos para el suministro de agentes terapéuticos a tumores sólidos

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica la prioridad sobre la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos n.º 61/222.469, presentada el 1 de julio de 2009, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/295.134, presentada el 14 de enero de 2010.

10

Antecedentes de la invención

La proliferación celular y la muerte celular programada desempeñan papeles importantes en el crecimiento y el desarrollo de un organismo. En las enfermedades proliferativas, tales como el cáncer, los procesos de proliferación celular y/o de muerte celular programada se encuentran normalmente alterados. Por ejemplo, una célula cancerosa puede tener una división celular desregulada bien mediante la expresión de un regulador positivo del ciclo celular o bien mediante la pérdida de un regulador negativo del ciclo celular, quizá debido a una mutación. Como alternativa, una célula cancerosa puede haber perdido la capacidad de sufrir muerte celular programada mediante la sobreexpresión de un regulador negativo de la apoptosis. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos que restauren el proceso de punto de control y de la muerte celular programada para células cancerosas.

15

20

La interferencia de ARN (iARN) es un proceso conservado a lo largo de la evolución en el que el reconocimiento de ARN bicatenario (ARNbc) da lugar en última instancia a la supresión postranscripcional de la expresión génica. En particular, la iARN induce la degradación específica del ARNm mediante emparejamiento de bases complementarias entre el ARNbc y el ARNm diana. En varios sistemas modelo, se ha desarrollado esta respuesta natural como una potente herramienta para la investigación de la función génica (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188-200 (2001); Hammond et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2:110-119 (2001)).

25

La iARN está mediada normalmente por ARNbc cortos, tales como dúplex de ARN pequeño de interferencia (ARNpi) de 21-23 nucleótidos de longitud o por ARNbc sustrato de Dicer mayores de 25-30 nucleótidos de longitud. A diferencia de los ARNpi, los ARNbc sustrato de Dicer son escindidos por la endonucleasa Dicer, un miembro de la familia de RNasa III, para producir dúplex de ARNpi 21-meros funcionales más pequeños. En ARNpi 21-mero (ya sea sintetizado o procesado por Dicer) recluta al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y posibilita un eficaz silenciamiento génico mediante la escisión específica de secuencia de la secuencia diana.

30

35

Aunque no está aún claro el mecanismo preciso, la iARN proporciona una estrategia potente para regular negativamente o silenciar la transcripción y la traducción de un gen de interés. En particular, para el tratamiento de trastornos neoplásicos, tales como el cáncer, puede usarse la iARN para modular (por ejemplo, reducir) la expresión de determinados genes, por ejemplo, una molécula anti-apoptótica, un factor de crecimiento, un receptor del factor de crecimiento, una proteína del huso mitótico, una proteína del ciclo celular, un factor angiogénico, un oncogén, un transductor de señales intracelulares, una chaperona molecular, y combinaciones de los mismos.

40

Sin embargo, se necesita un sistema de suministro de ácido nucleico seguro y eficaz para que la iARN sea terapéuticamente útil. Los vectores víricos son sistemas de suministro de genes relativamente eficaces, pero adolecen de una diversidad de limitaciones, tales como el potencial de reversión al tipo silvestre sí como problemas de respuesta inmunitaria. Además, los sistemas víricos se eliminan rápidamente de la circulación, limitando la transfección a órganos "de primer pase", tales como los pulmones, el hígado, y el bazo. Además, estos sistemas inducen respuestas inmunitarias que comprometen el suministro con inyecciones posteriores. Como resultado, los sistemas de suministro no víricos están recibiendo cada vez más atención (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)).

45

50

Los complejos de ácido nucleico y liposomas catiónicos (es decir, lipocomplejos) son un vehículo de suministro no vírico que se emplea normalmente. Por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.458.382 se divulgan lipocomplejos formados por un compuesto anfipático, un lípido neutro y un detergente para transfectar células de insectos. También se divulgan lipocomplejos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20030073640. Sin embargo, los lipocomplejos son sistemas grandes poco definidos que no son adecuados para aplicaciones sistémicas y pueden provocar efectos secundarios tóxicos considerables (Harrison et al., *Biotechniques*, 19:816 (1995); Li et al., *The Gene*, 4:891 (1997); Tam et al., *Gene Ther.*, 7:1867 (2000)). Como grandes agregados cargados positivamente, los lipocomplejos se eliminan rápidamente cuando se administran *in vivo*, observándose los máximos niveles de expresión en los órganos de primer pase, particularmente 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)).

55

60

65

Otros sistemas de suministro de liposomas incluyen, por ejemplo, el uso de micelas inversas, liposomas aniónicos, y

liposomas de polímero. Las micelas inversas se divulgan en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.429.200. Los liposomas aniónicos se divulgan en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20030026831. Los liposomas de polímero que incorporan dextrina o polímeros de glicerol-fosfolina se divulgan en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20020081736 y 20030082103, respectivamente. Sin embargo, dichos sistemas de suministro no son adecuados para suministrar ácidos nucleicos, tales como ARN de interferencia a tumores debido a que no son del tamaño deseado (es decir, de un diámetro menor de aproximadamente 150 nm), no se suministran preferencialmente a los sitios tumorales, y no se mantienen intactos en la circulación durante un periodo de tiempo prolongado para lograr el suministro a los sitios de tumor. Más bien, el suministro intracelular eficaz de ácidos nucleicos, tales como ARN de interferencia, a los tumores requiere de una partícula que contenga el ácido nucleico altamente estable y resistente en el suero que se dirija preferencialmente a los tumores, tales como tumores sólidos y no interactúe con células y otros componentes del compartimento vascular.

Por lo tanto, sigue habiendo una gran necesidad en la técnica de nuevas composiciones y métodos para introducir de manera preferencial ácidos nucleicos, tales como ARN de interferencia, en células tumorales. Además, existe la necesidad en la técnica de métodos para regular negativamente la expresión de genes asociados con la tumorigénesis o la transformación de células para tratar o prevenir el cáncer. La presente invención aborda estas y otras necesidades.

El documento US 2007/042031 A1 describe sistemas y métodos para producir liposomas. El documento US 2005/064595 A1 describe ARN de interferencia encapsulado en lípidos. El documento US 2006/008910 A1 describe ARN de interferencia encapsulado en lípidos. El documento US 2007/265438 A1 describe ARNpi que se dirige a la cinasa-1 similar a polo (PLK-1).

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende: (a) un ARNpi que silencia la expresión génica de la cinasa 1 similar a polo (PLK-1), que consiste en una secuencia de hebra no codificante 5'-UAAUUAAAGGAGGGUGAUCUUC-3' y una secuencia de hebra codificante 5'-AGAUCACCCUCCUUAAAUAUU-3', en la que los nucleótidos en negrita y subrayados son nucleótidos de 2'OMe; (b) un lípido catiónico que comprende de un 50 % en moles a un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende del 25 % en moles al 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas que comprende del 5 % en moles al 10 % en moles del lípido total presente en la partícula. En el presente documento se describen nuevas partículas de lípido estables en suero que comprenden uno o más agentes activos o agentes terapéuticos, métodos para producir las partículas de lípido, y métodos para suministrar y/o administrar las partículas de lípido (por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno). Más particularmente, en el presente documento se describen partículas estables en suero de ácido nucleico-lípido (SNALP) que comprenden un ácido nucleico (por ejemplo, uno o más ARN de interferencia), métodos para producir las SNALP, y métodos para suministrar y/o administrar las SNALP (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer).

En determinadas realizaciones preferidas, en el presente documento se describen partículas lipídicas dirigidas a tumores (por ejemplo, las SNALP dirigidas a tumores) que se dirigen preferencialmente a tumores sólidos. Ventajosamente, las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores son capaces de suministrar preferencialmente la carga de ácido nucleico a células de tumores sólidos en comparación con células no cancerosas. Además, se ha descubierto de manera inesperada que las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores que comprenden al menos un ARN de interferencia tal como se describen en el presente documento demuestran una potencia aumentada (es decir, una actividad de silenciamiento aumentada) y/o una tolerabilidad aumentada (por ejemplo, un perfil de toxicidad más favorable) cuando se dirigen a un gen de interés, tal como PLK-1 en una célula tumoral cuando se compara con otras composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido descritas previamente. En realizaciones preferidas, en el presente documento se describen partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que comprenden una o más (por ejemplo, un cóctel) de las moléculas de ARNpi para PLK-1 descritas en el presente documento y el lípido catiónico DLinDMA y métodos para usar las mismas, poseyendo dichas partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) de manera inesperada una potencia aumentada y una tolerabilidad aumentada cuando silencian la expresión de PLK-1 en células de tumores sólidos *in vivo* en comparación con otras composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido descritas previamente.

En algunos aspectos, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) descrita en el presente documento comprende: (a) uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia); (b) uno o más lípidos catiónicos que comprenden de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente un 25 % en moles a aproximadamente un 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia); (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente

un 50 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de los mismos que comprende de aproximadamente un 35 % en moles a aproximadamente un 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido se cita generalmente en el presente documento como la formulación "7:54". En determinados casos, la mezcla de lípido no catiónico en la formulación 7:54 comprende: (i) un fosfolípido de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente un 25 % en moles a aproximadamente un 35 % en moles del lípido total presente en la partícula. En una realización particular, la formulación 7:54 es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente un 7 % en moles de conjugado de PEG-lípido (por ejemplo, un conjugado de PEG-lípido que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA), aproximadamente un 54 % en moles de lípido catiónico o una sal del mismo (por ejemplo, DLinDMA y/o cualquier otro lípido catiónico, tal como se describe en el presente documento), aproximadamente un 7 % en moles de DPPC (o DSPC), y aproximadamente un 32 % en moles de colesterol (o un derivado del mismo). En realizaciones preferidas, el ácido nucleico presente en la formulación 7:54 es un ARN de interferencia, tal como un ARNpi.

En otras realizaciones descritas en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia); (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente un 30 % en moles a aproximadamente un 40 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido se cita generalmente en el presente documento como la formulación "7:58". En una realización particular, la formulación 7:58 es un sistema de tres componentes que está libre de fosfolípidos y comprende aproximadamente un 7 % en moles de conjugado de PEG-lípido (por ejemplo, un conjugado de PEG-lípido que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA), aproximadamente un 58 % en moles de lípido catiónico o una sal del mismo (por ejemplo, DLinDMA y/o cualquier otro lípido catiónico, tal como se describe en el presente documento), y aproximadamente un 35 % en moles de colesterol (o un derivado del mismo). Preferentemente, el ácido nucleico presente en la formulación 7:58 es un ARN de interferencia, tal como un ARNpi.

En determinadas realizaciones preferidas, el ácido nucleico (por ejemplo, ARN de interferencia) está completamente encapsulado en la porción de lípido de la partícula de ácido nucleico-lípido, de tal forma que el ácido nucleico es resistente en solución acuosa a la degradación por nucleasas. Los ejemplos no limitantes de ARN de interferencia incluyen ARNpi, ARNai, miARN, ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, y mezclas de los mismos. En otras realizaciones preferidas específicas, las partículas de ácido nucleico-lípido son sustancialmente no tóxicas para mamíferos, tales como seres humanos.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En el presente documento se describen también composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, SNALP) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para introducir un ácido nucleico en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula *in vitro* con una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención. También se describen en el presente documento métodos para introducir uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia) en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, SNALP). En una realización, la célula (por ejemplo, una célula cancerosa, tal como una célula de tumor sólido) se encuentra dentro de un mamífero y el mamífero es un ser humano.

En otro aspecto más, la presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido para su uso en un método para el suministro *in vivo* de un ácido nucleico a un tumor sólido, comprendiendo el método administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un mamífero. También se describen en el presente documento métodos para el suministro *in vivo* de uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia) a tumores sólidos, comprendiendo el método administrar a un mamífero una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, SNALP). Ventajosamente, las partículas de ácido nucleico-lípido de la invención suministran de manera preferencial el ácido nucleico a tumores sólidos en comparación con otros tejidos. En algunas realizaciones, las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) se administran mediante una de las siguientes rutas de administración: oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, e intradérmica. En realizaciones particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) se administran de manera sistémica, por ejemplo, por las rutas de administración entéricas o parenterales. En realizaciones preferidas, el mamífero es un ser humano.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido para su uso en un

método para tratar un trastorno de la proliferación celular, tal como un cáncer, en un mamífero que lo necesita, opcionalmente un ser humano, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha partícula de ácido nucleico-lípido. Además, en el presente documento se describen métodos para tratar un trastorno de la proliferación celular, tal como cáncer, en un mamífero que lo necesita, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que comprende uno o más ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia). En determinadas realizaciones, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) puede administrarse en combinación con un fármaco quimioterapéutico. La partícula de ácido nucleico-lípido puede administrarse conjuntamente además o como alternativa con agentes hormonales, inmunoterapéuticos y/o radioterapéuticos convencionales. En otras realizaciones determinadas, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) puede administrarse en combinación con una dosis de un glucocorticoide, tal como, por ejemplo, dexametasona, en las que el glucocorticoide se administra antes de (es decir, pretratamiento con el glucocorticoide), durante, y/o después de administrar la partícula de ácido nucleico-lípido. Los ejemplos no limitantes de regímenes de dosificación de glucocorticoide se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20070054873.

En un aspecto particular, en el presente documento se describen métodos para introducir un ARN de interferencia (por ejemplo, una molécula de ARNpi) que silencia la expresión de un gen asociado con la tumorigénesis o la transformación celular en una célula tumoral de un mamífero (por ejemplo, un ser humano), comprendiendo el método administrar al mamífero una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, SNALP), en el que el ARN de interferencia (por ejemplo, molécula de ARNpi) se introduce preferencialmente en la célula tumoral en comparación con otras células (por ejemplo, células normales o no tumorales).

Las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) son ventajosas y adecuadas para su uso en la administración de ácido nucleico, tal como ARN de interferencia, a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano) debido a que son estables en la circulación, de un tamaño necesario para un comportamiento farmacodinámico que da como resultado acceso a sitios extravasculares, y son capaces de alcanzar poblaciones de células diana (por ejemplo, células de tumores sólidos).

Otros objetos, características, y ventajas de la presente invención serán evidentes para un experto en la materia a partir de la siguiente descripción detallada y figuras.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra que se obtuvieron mejores eficacias de encapsulación cuando se usó un mayor % en moles de un conjugado de PEG750-lípido en formulaciones de SNALP.

La figura 2 muestra una comparación del perfil de eliminación en sangre de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA 1:57 y 7:54.

La figura 3 muestra una comparación de la actividad de silenciamiento de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA 1:57 y 7:54 en tejido hepático normal y en tumores hepáticos.

La figura 4 muestra una comparación de la actividad de silenciamiento de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA 1:57 y 7:54 en tumores subcutáneos.

La figura 5 muestra una comparación de la actividad de silenciamiento de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA y C2K 7:54 en tumores hepáticos.

La figura 6 muestra una comparación de la actividad de silenciamiento de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA y C2K 7:54 en tumores hepáticos a dos dosis diferentes.

La figura 7 muestra una comparación de la actividad de silenciamiento de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA y C2K 1:57 y 7:54 en tumores subcutáneos a dos dosis diferentes.

La figura 8 muestra otra comparación de la actividad de silenciamiento de las formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA y C2K 1:57 y 7:54 en tumores subcutáneos.

La figura 9 muestra una comparación de las potencias de diferentes lotes de formulaciones de SNALP de DLinDMA y C2K 7:54 en tumores subcutáneos.

La figura 10 muestra una comparación de la eficacia antitumoral de formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA y C2K 1:57 y 7:54 para reducir el volumen de tumor subcutáneo.

La figura 11 muestra el efecto de administrar formulaciones ejemplares de SNALP de DLinDMA y C2K 7:54 en los niveles de enzimas hepáticas.

La figura 12 muestra el efecto inmunogénico de administrar las formulaciones ejemplares de SNALP DLinDMA 1:57 o 7:54.

La figura 13 muestra una comparación de la actividad de silenciamiento génico de ARNm de PLK-1 tumoral de formulaciones ejemplares de SNALP 7:54 que contienen diversos lípidos catiónicos descritos en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención está basada, en parte, en el descubrimiento sorprendente de que las partículas lipídicas (por ejemplo, SNALP) que contienen un mayor % en moles de conjugados de PEG-lípido con longitudes menores de cadena de PEG confieren propiedades de direccionamiento a tumores beneficiosas a las partículas a la vez que mantienen elevadas eficacias de encapsulación de la carga. Ventajosamente, se ha descubierto que las partículas lipídicas dirigidas a tumores descritas en el presente documento están protegidas de manera más eficaz por el conjugado PEG-lípido después de la administración *in vivo* debido a que el conjugado de PEG-lípido se distribuye de manera más uniforme sobre la superficie de la partícula cuando está presente a una mayor concentración. Como resultado, las partículas de lípido descritas en el presente documento son capaces de dirigirse a sitios distales de tumores y proporcionan propiedades de direccionamiento a tumores deseables, tales como mayores tiempos de circulación en sangre, suministro tumoral potenciado, y suministro reducido a tejidos no tumorales. En determinadas realizaciones, las propiedades de direccionamiento a tumores de las partículas de lípido descritas en el presente documento están potenciadas además por el uso de conjugados de PEG-lípido con mayores longitudes de cadena alquílica, que se incorporan de manera más eficaz en la partícula y proporcionan tiempos de circulación en sangre mayores.

Usando la formulación de SNALP de DLinDMA 7:54 como formulación ejemplar de partícula lipídica dirigida a tumores, los ejemplos expuestos en el presente documento demuestran que las partículas lipídicas que contienen aproximadamente un 7 % en moles de un conjugado de PEG750-lípido proporcionan de manera ventajosa mejores eficacias de encapsulación de ácido nucleico, tiempos de circulación más prolongados, suministro tumoral potenciado, y suministro reducido a tejidos no tumorales cuando se comparan con partículas lipídicas que contienen un % en moles menor de un conjugado de PEG-lípido con una longitud de cadena de PEG mayor. Por ejemplo, el ejemplo 2 ilustra que se lograron mejores eficacias de encapsulación cuando se usó un mayor % en moles de un conjugado de PEG750-lípido, tal como PEG750-C-DMA. El ejemplo 3 ilustra que se observaron tiempos de circulación en sangre prolongados para la formulación de SNALP de DLinDMA 7:54 dirigida a tumores, posibilitando de este modo la acumulación y actividad aumentadas de dichas partículas en sitios tumorales distales. El ejemplo 4 ilustra que la formulación de SNALP DLinDMA 7:54 dirigida a tumores mostró una actividad de silenciamiento potenciada en tumores hepáticos en comparación con el tejido hepático normal. El ejemplo 5 ilustra que la formulación de SNALP de DLinDMA 7:54 dirigida a tumores mostró una potencia aumentada en sitios tumorales distales y por tanto, puede usarse para dirigirse de manera preferencial a tumores sólidos fuera del hígado. El ejemplo 8 ilustra que la formulación de SNALP de DLinDMA 7:54 dirigida a tumores es un sistema de suministro de ácido nucleico seguro y no inmunogénico. El ejemplo 9 ilustra que las formulaciones de SNALP 7:54 dirigidas a tumores que comprenden un lípido catiónico ilustrativo de fórmula II-XVI tal como se describe en el presente documento mostraron potencias similares a la de DLinDMA para silenciar la expresión de PLK-1.

Como tales, las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores descritas en el presente documento son capaces de suministrar de manera segura, eficaz y preferencial una carga de ácido nucleico a células de tumores sólidos en comparación con células no cancerosas.

II. Definiciones

Tal como se usan en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados adscritos a los mismos, a menos que se especifique lo contrario.

El término "ARN de interferencia" o "iARN" o la expresión "secuencia de ARN de interferencia", tal como se usan en el presente documento, incluyen ARN monocatenario (por ejemplo, miARN maduro, oligonucleótidos de iARNmc, oligonucleótidos de iADNmc), ARN bicatenario (es decir, ARN dúplex, tal como ARN_{pi}, ARN_{bc} sustrato de Dicer, ARN_{hc}, ARN_{ai}, o pre-miARN), un híbrido de ADN-ARN (véase, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 2004/078941), o un híbrido de ADN-ADN (véase, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 2004/104199) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen o secuencia diana (por ejemplo, mediando la degradación o inhibiendo la traducción de ARNm que son complementarios con la secuencia de ARN de interferencia) cuando el ARN de interferencia se encuentra en la misma célula que el gen o la secuencia diana. Por lo tanto, ARN de interferencia se refiere al ARN monocatenario que es complementario a una secuencia de ARNm diana o al ARN bicatenario formado por dos hebras complementarias o por una sola hebra autocomplementaria. El ARN de interferencia puede tener una identidad sustancial o completa con el gen o la secuencia diana, o puede comprender una región de desemparejamiento (es decir, un motivo de desemparejamiento). La secuencia del ARN de interferencia puede corresponder con el gen diana de longitud completa, o con una subsecuencia del mismo. Preferentemente, las moléculas de ARN de interferencia se sintetizan químicamente.

ARN de interferencia incluye "ARN pequeño de interferencia" o "ARN_{pi}", por ejemplo, ARN de interferencia de aproximadamente 15-60, 15-50, o 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más típicamente aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud, y es preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARN_{pi} bicatenario tiene 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 nucleótidos de longitud, y el ARN_{pi} bicatenario tiene aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, o 19-25 pares de bases de longitud, preferentemente aproximadamente 18-22, 19-20, o 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARN_{pi} pueden comprender salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4

nucleótidos o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos y extremos fosfato 5'. Los ejemplos de ARNpi incluyen, sin limitación, una molécula de polinucleótido bicatenario ensamblada a partir de dos moléculas de cadena separada, en los que una hebra es la hebra codificante y la otra es la hebra complementaria no codificante; una molécula de polinucleótido bicatenario ensamblada a partir de una molécula monocatenaria, donde las regiones codificantes y no codificantes están enlazadas por un enlazador basado en ácidos nucleicos o no basado en ácidos nucleicos; una molécula de polinucleótido bicatenaria con una estructura secundaria en horquilla que tiene regiones codificantes y no codificantes auto-complementarias; y una molécula de polinucleótido monocatenaria circular con dos o más estructuras de bucle y un tallo que tiene regiones codificantes y no codificantes auto-complementarias, donde el polinucleótido circular puede procesarse *in vivo* o *in vitro* para generar una molécula de ARNpi bicatenaria activa. Tal como se usa en el presente documento, el término "ARNpi" incluye dúplex de ARN-ARN así como híbridos de ADN-ARN (véase, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 2004/078941).

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

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones "motivo de desemparejamiento" o "región desemparejada" se refieren a una parte de una secuencia de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) que no tiene una complementariedad del 100 % con su secuencia diana. Un ARN de interferencia puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más regiones desemparejadas. Las regiones desemparejadas pueden ser contiguas o pueden estar separadas por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más nucleótidos. Los motivos o regiones desemparejadas pueden comprender un solo nucleótido o pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco, o más nucleótidos.

La expresión "inhibir la expresión de un gen diana" se refiere a la capacidad de un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) para silenciar, reducir, o inhibir la expresión de un gen diana (por ejemplo, PLK-1). Para examinar el alcance del silenciamiento génico, se pone en contacto una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de células en cultivo que expresan el gen diana) o un mamífero de ensayo (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano o un modelo animal, tal como un modelo de roedor (por ejemplo, ratón) o de primate no humano (por ejemplo, mono)) con un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) que silencia, reduce, o inhibe la expresión del gen diana. La expresión del gen diana en la muestra de ensayo o en los animales de ensayo se compara con la expresión del gen diana en una muestra de control (por ejemplo, una muestra de células en cultivo que expresan el gen diana) o un mamífero de control (por ejemplo, un mamífero, tal como un ser humano o un modelo animal, tal como un modelo de roedor (por ejemplo, ratón) o de primate no humano (por ejemplo, mono)) que no se pone en contacto con o se le administra el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi). A la expresión del gen diana en una muestra de control o en un mamífero de control puede asignársele un valor del 100%. En realizaciones particulares, puede lograrse el silenciamiento, la inhibición o la reducción de la expresión de un gen diana cuando el nivel de expresión del gen diana en la muestra de ensayo o en el mamífero de ensayo en relación al nivel de expresión del gen diana en la muestra de control o en el mamífero de control es de aproximadamente el 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, o 0%. En otras palabras, los ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) de la presente invención son capaces de silenciar, reducir, o inhibir la expresión de un gen diana (por ejemplo, PLK-1) en al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100% en una muestra de ensayo o en un animal de ensayo en relación al nivel de expresión del gen diana en una muestra de control o en un animal de control al que no se le ha puesto en contacto con o administrado el ARN de interferencia. Los ensayos adecuados para determinar el nivel de expresión del gen diana incluyen, sin limitación, examen de los niveles de proteína o de ARNm usando técnicas conocidas para los expertos en la materia, tales como, por ejemplo, transferencias de puntos, transferencias de Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

Una "cantidad eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un principio activo o agente terapéutico, tal como un ARN de interferencia, es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, por ejemplo, una inhibición de la expresión de una secuencia diana en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia de un ARN de interferencia. La inhibición de la expresión de un gen diana o de una secuencia diana se logra cuando el valor obtenido con un ARN de interferencia en relación con el control es de aproximadamente el 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, o 0%. Los ensayos adecuados para medir la expresión de un gen diana o de una secuencia diana incluyen, por ejemplo, examen de los niveles de proteína o de ARN usando técnicas conocidas para los expertos en la materia, tales como transferencias

por puntos, transferencias de Northern, hibridación *in situ*, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la materia.

Por "disminuir", "disminución", "reducir", o "reducción" de una respuesta inmunitaria mediante un ARN de interferencia se pretende hacer referencia a una reducción detectable de una respuesta inmunitaria para un ARN de interferencia determinado (por ejemplo, un ARN de interferencia modificado). La cantidad de reducción de una respuesta inmunitaria mediante un ARN de interferencia modificado puede determinarse en relación al nivel de una respuesta inmunitaria en presencia de un ARN de interferencia no modificado. Una reducción detectable puede ser de aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, o menor que la respuesta inmunitaria detectada en presencia del ARN de interferencia no modificado. Una reducción en la respuesta inmunitaria para el ARN de interferencia se mide típicamente por una reducción en la producción de citocinas (por ejemplo, IFN γ , IFN α , TNF α , IL-6, IL-8, o IL-12) por una célula sensible *in vitro* o una reducción en la producción de citocinas en el suero de un sujeto mamífero después de la administración del ARN de interferencia.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "célula sensible" se refiere a una célula, preferentemente una célula de mamífero, que produce una respuesta inmunitaria detectable cuando se pone en contacto con una ARN de interferencia inmunoestimulador, tal como un ARNpi no modificado. Las células sensibles ejemplares incluyen, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos, y similares. Las respuestas inmunitarias detectables incluyen, por ejemplo, la producción de citocinas o factores de crecimiento, tales como TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, TGF, y combinaciones de los mismos. Las respuestas inmunitarias detectables también incluyen, por ejemplo, la inducción de ARNm de proteína inducida por interferón con repeticiones de tetratricopéptido 1 (IFIT1).

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

La expresión "condiciones de hibridación rigurosas" se refiere a condiciones en las que hibridará un ácido nucleico con su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones rigurosas son dependientes de secuencia y serán diferentes en circunstancias distintas. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas mayores. Puede hallarse una guía exhaustiva acerca de la hibridación de ácidos nucleicos en Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones rigurosas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C menores que el punto térmico de fusión (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH, y concentración de ácido nucleico definidas) a la que el 50% de las sondas complementarias con la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , en 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). También pueden lograrse condiciones rigurosas mediante la adición de agentes desestabilizantes, tales como formamida. Para una hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos el doble de la de fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo.

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

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

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

Para la comparación de secuencias, una secuencia actúa típicamente como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y las de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Pueden usarse los parámetros por defecto del programa, o pueden designarse parámetros alternativos. Después, el algoritmo de comparación de secuencias calcula los porcentajes de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo en relación a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal como se usa en el presente documento, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de una serie de posiciones contiguas seleccionadas entre el grupo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 45, más normalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, en la que puede compararse una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se alineen de manera óptima las dos secuencias. Son de sobra conocidos en la técnica los métodos de alineamiento de secuencias para su comparación. Puede llevarse a cabo un alineamiento óptimo de secuencias para comparación, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2444 (1988), mediante implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (1995 suplemento)).

Los ejemplos no limitantes de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y de 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 Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215:403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en el presente documento, para determinar el porcentaje identidad de secuencia para los ácidos nucleicos de la invención. El programa informático para llevar a cabo análisis BLAST está disponible de manera pública a través del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Otro ejemplo es un algoritmo de alineamiento global para determinar el porcentaje identidad de secuencia, tal como el algoritmo Needleman-Wunsch para alinear secuencias de proteínas o de nucleótidos (por ejemplo, ARN).

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

La expresión "ácido nucleico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria e incluye ADN, ARN, e híbridos de los mismos. El ADN puede estar en forma de, por ejemplo, moléculas no codificantes, ADN de plásmido, dúplex de ADN-ADN, ADN pre-condensado, productos de la PCR, vectores (PI, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico, o derivados y combinaciones de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARN pequeño de interferencia (ARNpi), ARNbc sustrato de Dicer, ARN en horquilla corta (ARNhc), ARN de interferencia asimétrico (ARNia), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARNt, ARN vírico (ARNv), y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos de estructura o engarces modificados, que son sintéticos, de origen natural, y de origen no natural, y que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, ribonucleótidos de 2'-O-metilo, y ácidos peptidonucleicos (APN). A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. Salvo que se indique lo contrario, una secuencia de ácido

nucleico particular también abarca de manera implícita variantes modificadas de manera conservativa de las mismas (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP, y secuencias complementarias, así como la secuencia indicada de manera explícita. Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degenerados generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye con una base mixta y/o restos de desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes*, 8:91-98 (1994)). Los "nucleótidos" contienen un azúcar de desoxirribosa (ADN) o de ribosa (ARN), una base, y un grupo fosfato. Los nucleótidos se enlazan entre sí a través de los grupos fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen además los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina, y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero sin limitación, modificaciones que colocan nuevos grupos reactivos, tales como, pero sin limitación, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos, y haluros de alquilo.

El término "gen" se refiere a una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN) que comprende secuencias codificantes de longitud parcial o de longitud completa necesarias para la producción de un polipéptido o precursor de polipéptido (por ejemplo, PLK-1).

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

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

La expresión "partícula lipídica" incluye una formulación lipídica que puede usarse para suministrar un principio activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia), a un sitio diana de interés (por ejemplo, célula, tejido, órgano, y similares). En realizaciones preferidas, la partícula lipídica de la invención es una partícula de ácido nucleico-lípido, que típicamente se forma a partir de un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y opcionalmente un lípido conjugado que previene la agregación de la partícula. En otras realizaciones preferidas, el principio activo o el agente terapéutico, tal como un ácido nucleico, puede estar encapsulado en la porción lipídica de la partícula, protegiéndolo de este modo frente a la degradación enzimática.

Tal como se usan en el presente documento, el término "SNALP" se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípido estable. Una SNALP representa una partícula formada por lípidos (por ejemplo, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y opcionalmente un lípido conjugado que previene la agregación de la partícula), en la que el ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia) está completamente encapsulado en el lípido. En determinados casos, las SNALP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que pueden mostrar tiempos de circulación prolongados después de su inyección intravenosa (i.v.), pueden acumularse en sitios distales (por ejemplo, sitios separados físicamente del sitio de administración), y pueden mediar el silenciamiento de la expresión del gen diana en los sitios distales. El ácido nucleico puede estar complejado con un agente de condensación y encapsulado dentro de una SNALP tal como se expone en la Publicación PCT n.º WO 00/03683.

Las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) tienen típicamente un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, o de aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas lipídicas de la presente invención, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se divulgan en, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20040142025 y 20070042031.

Tal como se usa en el presente documento, "lípidos encapsulados" puede hacer referencia a una partícula lipídica que proporciona un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia que se dirige a PLK-1), con encapsulación completa, encapsulación parcial, o ambas. En una realización preferida, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica (por ejemplo, para formar una SNALP u otra partícula de ácido nucleico-lípido).

La expresión "conjugado lipídico" se refiere a un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas lipídicas. Dichos conjugados lipídicos incluyen, pero sin limitación, conjugados de PEG-lípido tales como, por ejemplo, PEG acoplado a dialquilpropilos (por ejemplo, conjugados de PEG-DAA), PEG acoplado a diacilgliceroles (por ejemplo, conjugados de PEG-DAG), PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, y PEG conjugado a ceramidas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.885.613), lípidos catiónicos-PEG, conjugados

lipídicos de polioxazolidina (POZ) (por ejemplo, conjugados POZ-DAA; véase, por ejemplo, la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/294.828, presentada el 13 de enero de 2010, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/295, 140, presentada el 14 de enero de 2010), oligómeros de poliamida (por ejemplo, conjugados de ATTA-lípido), y mezclas de los mismos. Los ejemplos adicionales de conjugados de POZ-lípido se describen en la

5 Publicación PCT n.º WO 2010/006282. Pueden conjugarse PEG o POZ directamente al lípido o pueden unirse al lípido mediante un resto enlazador. Puede usarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplar el PEG o el POZ a un lípido, incluyendo, por ejemplo, restos enlazadores que no contienen éster y restos enlazadores que contienen éster. En determinadas realizaciones preferidas, se usan restos enlazadores que no contienen éster, tales como

10 amidas y carbamatos.

La expresión "lípido anfipático" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado en el que la porción hidrófoba del material lipídico se orienta al interior de una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas se derivan de la presencia de grupos polares o cargados, tales como

15 carbohidratos, fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo, y otros grupos similares. Puede conferirse hidrofobicidad mediante la inclusión de grupos apolares que incluyen, pero sin limitación, grupos hidrocarburo alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y grupos similares sustituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplos de compuestos anfipáticos incluyen, pero sin limitación, fosfolípidos, aminolípidos, y esfingolípidos.

Los ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, pero sin limitación, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina, y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como las familias de esfingolípidos, glucoesfingolípidos, diacilgliceroles, y β -aciloxiácidos, también se encuentran dentro del grupo indicado como lípidos

25 anfipáticos. Además, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos, incluyendo triglicéridos y esteroides.

La expresión "lípido neutro" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en forma tanto no cargada como zwitteriónica neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo,

30 diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiolina, cefalina, colesterol, cerebrósidos, y diacilgliceroles.

La expresión "lípido no catiónico" se refiere a cualquier lípido anfipático, así como cualquier otro lípido neutro o lípido aniónico.

35

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

40 neutros.

La expresión "lípido hidrófobo" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero sin limitación, grupos hidrocarburo alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y grupos similares opcionalmente sustituidos por uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplos adecuados incluyen, pero sin

45 limitación, diacilglicerol, dialquilglicerol, N-N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano, y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de una partícula lipídica, tal como una SNALP, para fusionarse con las membranas de una célula. Las membranas pueden ser la membrana plasmática o las membranas que rodean a los orgánulos, por ejemplo, endosoma, núcleo, etc.

50

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, agua.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "solución orgánica lipídica" se refiere a una composición que comprende en su totalidad, o en parte, un disolvente orgánico que tiene un lípido.

55

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

60

"Estable en suero" con relación a partículas de ácido nucleico-lípido, tales como SNALP, significa que la partícula no se degrada significativamente después de su exposición a un ensayo de suero o de nucleasa que podría degradar de manera significativa el ADN o el ARN libre. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo en suero convencional, un ensayo de DNasa, o un ensayo de RNasa.

65

"Administración sistémica", tal como se usa en el presente documento, se refiere al suministro de partículas lipídicas

que da lugar a una amplia biodistribución de un agente activo, tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) en un organismo. Algunas técnicas de administración pueden dar lugar al suministro sistémico de determinados agentes, pero no de otros. La administración sistémica significa que una cantidad útil, preferentemente terapéutica, de un agente está expuesta a la mayoría de partes del organismo. Para obtener una amplia biodistribución, se requiere generalmente un tiempo de vida en sangre tal que el agente no se degrada o elimina rápidamente (tal como por órganos de primer pase (hígado, pulmón, etc.) o por una rápida unión celular inespecífica) antes de que lleguen a un sitio de enfermedad distal al sitio de administración. La administración sistémica de partículas lipídicas puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, e intraperitoneal. En una realización preferida, la administración sistémica de partículas lipídicas es mediante administración intravenosa.

"Administración local", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de un agente activo, tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) directamente a un sitio diana dentro de un organismo. Por ejemplo, puede administrarse localmente un agente mediante inyección directa en un sitio de enfermedad, tal como un tumor u otro sitio diana, tal como un sitio de inflamación o un órgano diana, tal como el hígado, corazón, páncreas, riñón, y similares.

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

El término "cáncer" se refiere a cualquier miembro de una clase de enfermedades que se caracteriza por el crecimiento no controlado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres y afecciones neoplásicas conocidas, ya se caractericen como malignas, benignas, de tejidos blandos, o sólidos, y cánceres de todos los estadios y grados, incluyendo cánceres pre y post-metastásicos. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero sin limitación, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer del conducto biliar, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de esófago; cáncer de vesícula biliar, cáncer de páncreas, cáncer de apéndice, cáncer de mama, cáncer de ovario; cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer del sistema nervioso central, glioblastoma, cáncer de piel, linfomas, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, sarcomas osteogénicos, y cánceres hematológicos. Los ejemplos no limitantes de tipos específicos de cáncer de hígado incluyen carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer hepático secundario (por ejemplo, causado por la metástasis de algún otro tipo celular de cáncer no hepático), y hepatoblastoma. Tal como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

El término "cinasa 1 similar a polo", "PLK-1", "cinasa similar a polo", o "PLK" se refiere a una serina/treonina cinasa que contiene dos dominios funcionales: (1) un dominio de cinasa; y (2) un dominio de caja de polo (véase, por ejemplo, Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)). La actividad y concentración celular de PLK-1 son cruciales para la regulación precisa de la división celular. La expresión y la actividad de PLK-1 son bajas a lo largo de las fases G0, G1, y S del ciclo celular, pero comienzan a aumentar en G2 y alcanzan su máximo durante la fase M. PLK-1 es esencial para la mitosis y la división celular y contribuye a los siguientes procesos: maduración del centrosoma y la activación de los factores promotores de la maduración por Cdc25C y fosforilación de ciclina B1; formación del huso bipolar; y adaptación del punto de control de daño en el ADN (el daño en el ADN inhibe a PLK-1 en G2 y la mitosis). PLK-1 también está implicada en la activación de componentes del complejo promotor de la anafase para la salida mitótica y la citocinesis. PLK-1 está sobreexpresada en muchos tipos de cáncer, incluyendo el hepatoma y el cáncer de colon, y la expresión de PLK-1 a menudo se correlaciona con un mal pronóstico para el paciente. La sobreexpresión de PLK-1 (de tipo silvestre o inactiva como cinasa) da como resultado multinucleación (inestabilidad genética). PLK-1 hiperactiva evita el punto de control de daño en el ADN. La expresión constitutiva de PLK-1 causa la transformación de células NIH 3T3. PLK-1 fosforila al supresor tumoral p53, inhibiendo de este modo los efectos proapoptóticos de p53. Las secuencias de ARNm de PLK-1 humana se exponen en los n.º de referencia de GenBank NM_005030, X73458, BC014846, BC003002, HSU01038, y L19559. Se expone una secuencia de ARNm de PLK-1 de ratón en el n.º de referencia de GenBank NM_011121. PLK-1 se conoce también como serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13).

III. Descripción de las realizaciones

En el presente documento se describen nuevas partículas de lípido estables en suero que comprenden uno o más agentes activos o agentes terapéuticos, métodos para producir las partículas de lípido, y métodos para suministrar y/o administrar las partículas de lípido (por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno).

En determinadas realizaciones, el agente activo o el agente terapéutico comprende un ácido nucleico. En algunos casos, el ácido nucleico comprende una molécula de ARN de interferencia, tal como, por ejemplo, un ARNpi, ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNai, miARN, o mezclas de los mismos. En otros casos, el ácido nucleico comprende ADN monocatenario o bicatenario, ARN, o un híbrido de ADN/ARN, tal como, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un plásmido, un oligonucleótido inmunoestimulador, o mezclas de los mismos.

En un aspecto, en el presente documento se describen partículas lipídicas que comprenden: (a) uno o más agentes

activos o agentes terapéuticos; (b) uno o más lípidos catiónicos que comprenden de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente un 25 % en moles a aproximadamente un 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula.

Más en particular, en el presente documento se describen partículas estables en suero de ácido nucleico-lípido (SNALP) que comprenden un ácido nucleico (por ejemplo, uno o más ARN de interferencia), métodos para producir las SNALP, y métodos para suministrar y/o administrar las SNALP (por ejemplo, para el tratamiento del cáncer). En determinadas realizaciones preferidas, en el presente documento se describen partículas lipídicas dirigidas a tumores (por ejemplo, las SNALP dirigidas a tumores) que se dirigen preferencialmente a tumores sólidos. Ventajosamente, las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores descritas en el presente documento son capaces de suministrar preferencialmente una carga de ácido nucleico, tal como un ARN de interferencia, que silencia la expresión de un gen asociado con la tumorigénesis o la transformación celular a células de tumores sólidos en comparación con células no cancerosas.

En algunos aspectos, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprende: (a) un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia); (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente un 25 % en moles a aproximadamente un 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas que comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia); (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de los mismos que comprende de aproximadamente un 35 % en moles a aproximadamente un 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido se cita generalmente en el presente documento como la formulación "7:54".

En otras determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia); (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente un 30 % en moles a aproximadamente un 40 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido se cita generalmente en el presente documento como la formulación "7:58".

En realizaciones particulares descritas en el presente documento, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARN_{pi}) se dirige a un gen de interés en una célula tumoral, tal como PLK-1. En algunos casos, el ARN de interferencia comprende una hebra codificante y una hebra complementaria no codificante, y el ARN de interferencia comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 15-60, 15-30, 15-25, 19-30, 19-25, 20-60, 20-55, 20-50, 20-45, 20-40, 20-35, 20-30, 20-25, 21-30, 21-29, 22-30, 22-29, 22-28, 23-30, 23-28, 24-30, 24-28, 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, o 25-30 nucleótidos de longitud, o aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, o 35 nucleótidos de longitud). En otros casos, el ARN de interferencia se sintetiza químicamente. Las moléculas de ARN de interferencia de la presente invención son capaces de silenciar la expresión de una secuencia diana, tal como PLK-1 *in vitro* y/o *in vivo*.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARN_{pi}) puede comprender al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos de 2'OMe, por ejemplo, en la hebra codificante y/o no codificante de la región bicatenaria del ARN de interferencia. Preferentemente, los nucleótidos de uridina y/o guanosina en el ARN de interferencia se modifican con nucleótidos de 2'OMe. En determinados casos, el ARN de interferencia contiene nucleótidos de 2'OMe tanto en la hebra codificante como en la no codificante y comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-uridina y al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina en la región bicatenaria. En algunas realizaciones, la hebra codificante y/o no codificante del ARN de interferencia puede comprender además nucleótidos de adenosina modificados (por ejemplo, modificados con 2'OMe) y/o nucleótidos de citosina modificados (por ejemplo, modificados con 2'OMe), por ejemplo, en la región bicatenaria del ARN de interferencia.

En algunas realizaciones, las secuencias de la hebra codificante y/o no codificante pueden comprender al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos

de 2'OMe. En determinadas realizaciones, las secuencias de la hebra codificante y/o no codificante pueden comprender o consistir cada una independientemente en un saliente 3' modificado (por ejemplo, 2'OMe) y/o no modificado de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos, o uno o ambos extremos de la molécula bicatenaria puede tener extremos romos.

5 Un experto en la materia entenderá que las secuencias de la hebra codificante y/o no codificante no modificadas pueden modificarse de acuerdo con los patrones de modificación selectiva descritos en el presente documento (por ejemplo, en nucleótidos de uridina y/o guanosina seleccionados, y opcionalmente en nucleótidos de adenosina y/o citosina, con el dúplex de ARN), y explorarse respecto de la actividad de iARN así como de estimulación inmunitaria, de tal forma que el grado de las modificaciones químicas introducidas en la molécula de ARN de interferencia impone un equilibrio entre la reducción o supresión de las propiedades inmunoestimulantes del ARN de interferencia y la retención de la actividad de iARN.

15 En realizaciones particulares, las moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritas en el presente documento comprenden un saliente 3' de 1, 2, 3, o 4 nucleótidos en una o ambas hebras. En determinados casos, el ARN de interferencia puede contener al menos un extremo romo. En realizaciones particulares, los salientes 3' en una o ambas hebras del ARN de interferencia pueden comprender cada una independientemente 1, 2, 3, o 4 nucleótidos de desoxitimidina modificados y/o no modificados ("t" o "dT"), 1, 2, 3, o 4 ribonucleótidos de uridina modificados (por ejemplo, 2'OMe) y/o no modificados ("U"), o 1, 2, 3, o 4 ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos modificados (por ejemplo, 2'OMe) y/o no modificados que tienen complementariedad para la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma.

25 En otra realización, en el presente documento se describe una composición que comprende un cóctel (por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más) secuencias de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) modificadas o no modificadas que se dirigen a uno o más genes de interés en una célula tumoral, tales como PLK-1. El cóctel de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) puede comprender secuencias que se dirigen a la misma región o dominio (por ejemplo, un "punto caliente") y/o a diferentes regiones o dominios de uno o más genes diana. En realizaciones particulares, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, o más (por ejemplo, todas) estas secuencias se encuentran modificadas químicamente (por ejemplo, modificadas con 2'OMe) tal como se describe en el presente documento.

35 En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, la hebra codificante comprende o consiste en una secuencia que es al menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a la secuencia diana o a una parte de la misma. En otras realizaciones determinadas, la hebra codificante comprende o consiste en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, o 19 nucleótidos contiguos) de una secuencia que es idéntica a la secuencia diana o una parte de la misma. En realizaciones preferidas, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) que comprende dicha secuencia de hebra codificante es capaz de mediar la iARN específica de diana.

40 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la hebra no codificante comprende o consiste en una secuencia que es al menos aproximadamente un 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% complementaria a la secuencia diana o a una parte de la misma. En otras realizaciones, la hebra no codificante comprende o consiste en al menos aproximadamente 15 nucleótidos contiguos (por ejemplo, al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, o 19 nucleótidos contiguos) de una secuencia que es complementaria a la secuencia diana o una parte de la misma. En realizaciones adicionales, la hebra no codificante comprende o consiste en una secuencia que hibrida específicamente con la secuencia diana o una parte de la misma. En realizaciones preferidas, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) que comprende dicha secuencia de hebra no codificante es capaz de mediar la iARN específica de diana.

50 En una realización preferida descrita en el presente documento, el ARNpi para PLK-1 comprende una hebra no codificante que comprende la siguiente secuencia: 5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCU-3'. En otra realización preferida, el ARNpi para PLK-1 comprende además una hebra codificante que comprende la siguiente secuencia: 5'-AGAUCACCCUCCUUAAUA-3'. En algunas realizaciones, el ARNpi para PLK-1 comprende al menos un nucleótido de 2'OMe, por ejemplo, al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y/o 2'OMe-uridina. En determinados casos, el ARNpi para PLK-1 comprende una hebra no codificante que comprende al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, o más nucleótidos de 2'OMe, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina y/o 2'OMe-uridina.

65 En realizaciones particulares descritas en el presente documento, aproximadamente un 20%-40%, 25%-40%, 30%-40%, 20%-35%, 25%-35%, 20%-30%, 25%-30%, 26%-34%, 27%-33%, 28%-32%, o aproximadamente un 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, o 40% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos modificados tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe

(por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina y/o 2'OMe-uridina).

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el ARNpi para PLK-1 de la invención comprende un saliente 3' en una o ambas hebras del ARNpi. En una realización particular, la hebra no codificante comprende un saliente 5'-UC-3' y la hebra codificante comprende un saliente 5'-UU-3'. En determinados casos, los salientes 3' en una o ambas hebras del ARNpi comprenden al menos un nucleótido de 2'OMe, por ejemplo, al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y/o 2'OMe-uridina. En otras realizaciones, los salientes 3' en una o ambas hebras de la molécula de ARNpi comprenden 1-4 nucleótidos de desoxitimidina (dT), 1-4 ribonucleótidos modificados o no modificados de uridina (U), y 1-2 ribonucleótidos adicionales que tienen complementariedad para la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el ARNpi para PLK-1 comprende una de las siguientes hebras codificantes expuestas en la tabla 1, en las que los nucleótidos en negrita y subrayados son nucleótidos de 2'OMe.

Tabla 1

Nombre	Secuencia de hebra codificante	Nombre	Secuencia de hebra codificante
S-1	5'-AGAU <u>CACCCUCCU</u> UAAAUAUU-3'	S-6	5'-AG <u>AUCACCCUCCU</u> UAAAUAUU-3'
S-2	5'-AGAU <u>CACCCUCCU</u> UAAAUAUU-3'	S-7	5'-AGAU <u>CACCCUCCUU</u> AAAUAUU-3'
S-3	5'-AGAU <u>CACCCUCCU</u> UAAAUAUU-3'	S-8	5'-AG <u>AUCACCCUCCU</u> UAAAUAUU-3'
S-4	5'-AGAU <u>CACCCUCCU</u> UAAAUAUU-3'	S-9	5'-AG <u>AUCACCCUCCUU</u> AAAUAUU-3'
S-5	5'-AGAU <u>CACCCUCCUU</u> AAAUAUU-3'	S-10	5'-AG <u>AUCACCCUCCUU</u> AAAUAUU-3'

En otras realizaciones descritas en el presente documento, el ARNpi para PLK-1 comprende una de las siguientes hebras no codificantes expuestas en la tabla 2, en las que los nucleótidos en negrita y subrayados son nucleótidos de 2'OMe.

Tabla 2

Nombre	Secuencia de hebra no codificante	Nombre	Secuencia de hebra no codificante
AS-A	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU-3'	AS-61	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCUU</u> C-3'
AS-B	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU-3'	AS-62	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCUU</u> C-3'
AS-C	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU-3'	AS-63	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUC <u>UU</u> C-3'
AS-D	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-64	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUC <u>UUC</u> -3'
AS-E	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-65	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-F	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-66	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-G	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU-3'	AS-67	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-H	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUU-3'	AS-68	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCUU</u> C-3'
AS-1	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-69	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-2	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-70	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-3	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-71	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-4	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-72	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-5	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-73	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-6	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-74	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-7	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-75	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-8	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-76	5'-UA <u>UUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-9	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-77	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-10	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-78	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'
AS-11	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'	AS-79	5'- <u>UAUUUAAGGAGGGUGAUCU</u> UC-3'

Nombre	Secuencia de hebra no codificante	Nombre	Secuencia de hebra no codificante
AS-12	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-80	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-13	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-81	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-14	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-82	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-15	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-83	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-16	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-84	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-17	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-85	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-18	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-86	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-19	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-87	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-20	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-88	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-21	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-89	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-22	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-90	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-23	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-91	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-24	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-92	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-25	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-93	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-26	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-94	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-27	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-95	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-28	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-96	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-29	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-97	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-30	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-98	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-31	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-99	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-32	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-100	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-33	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-101	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-34	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-102	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-35	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-103	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-36	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-104	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-37	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-105	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-38	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-106	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-39	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-107	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-40	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-108	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-41	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-109	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-42	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-110	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-43	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-111	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-44	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-112	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-45	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-113	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-46	5'-UAUUUAA <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-114	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-47	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-115	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-48	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-116	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-49	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-117	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'
AS-50	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'	AS-118	5'- <u>UAUUUAA</u> <u>GGAGGGU</u> <u>GAUCUUC</u> -3'

Nombre	Secuencia de hebra no codificante	Nombre	Secuencia de hebra no codificante
AS-51	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-119	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-52	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-120	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-53	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-121	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-54	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-122	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-55	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-123	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-56	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-124	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-57	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-125	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-58	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-126	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-59	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'	AS-127	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'
AS-60	5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3'		

- En una realización preferida descrita en el presente documento, el ARNpi para PLK-1 comprende: una hebra no codificante que comprende la secuencia 5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCU-3' y al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más nucleótidos de 2'OMe, por ejemplo, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más nucleótidos de 2'OMe-guanosina y/o 2'OMe-uridina; y una hebra codificante que comprende la secuencia 5'-AGAUCACCCUCCUUA AAAUAU-3' y al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más nucleótidos de 2'OMe, por ejemplo, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más nucleótidos de 2'OMe-guanosina y/o 2'OMe-uridina. En otra realización preferida, el ARNpi para PLK-1 descrito en el presente documento comprende una hebra codificante que comprende los nucleótidos 1-19 de una cualquiera de S-1 a S-10; y una hebra no codificante que comprende los nucleótidos 1-19 de una cualquiera de AS-A a AS-H o de AS-1 a AS-127. En realizaciones particularmente preferidas descritas en el presente documento, el ARNpi para PLK-1 consiste en: una hebra codificante seleccionada entre una cualquiera de S-1 a S-10; y una hebra no codificante seleccionada entre una cualquiera de AS-A a AS-H o de AS-1 a AS-127.
- El ARNpi para PLK-1 de la partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención consiste en las siguientes secuencias de hebra codificante y no codificante:

5'-AGAUCACCCUCCUUA AAAUAU-3'
3'-CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5',

("S-3 + AS-F", "PLK1424 S3/ASF", o "PLK1424 2/6"), en las que los nucleótidos en negrita y subrayados son nucleótidos de 2'OMe.

Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que el ARNpi para PLK-1 anterior también puede modificarse químicamente, si se desea, para reducir sus propiedades inmunoestimuladoras, a la vez que se mantienen sus actividades de silenciamiento.

Las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprenden típicamente uno o más (por ejemplo, un cóctel) de los ARN de interferencia descritos en el presente documento, un lípido catiónico, y un lípido no catiónico. En determinados casos, las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprenden además un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. Preferentemente, las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprenden uno o más (por ejemplo, un cóctel) de los ARN de interferencia descritos en el presente documento, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. En realizaciones particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) descritas en el presente documento comprenden 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más ARN de interferencia no modificados y/o modificados que silencian a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o más genes diferentes asociados con un trastorno de la proliferación celular, tales como cáncer, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas.

En algunas realizaciones, los ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) están completamente encapsulados en la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP). Con respecto a las formulaciones que comprenden un cóctel de ARN de interferencia, los diferentes tipos de especies de ARN de interferencia presentes en el cóctel (por ejemplo, compuestos de ARN de interferencia con diferentes secuencias) pueden encapsularse conjuntamente en la misma partícula, o puede encapsularse cada tipo de especie de ARN de interferencia presente en el cóctel en una partícula separada. El cóctel de ARN de interferencia puede formularse en las partículas descritas en el presente documento usando una mezcla de dos o más ARN de interferencia individuales (que tienen cada uno una secuencia única) a concentraciones o proporciones molares idénticas, similares, o diferentes. En una realización, se formula un cóctel de ARN de interferencia (correspondientes a una diversidad de ARN de interferencia con diferentes secuencias) usando concentraciones o proporciones molares idénticas, similares, o diferentes de cada especie de

ARN de interferencia, y los diferentes tipos de ARN de interferencia se encapsulan conjuntamente en la misma partícula. En otra realización, cada tipo de especie de ARN de interferencia presente en el cóctel se encapsula en diferentes partículas a concentraciones o proporciones molares idénticas, similares, o diferentes de ARN de interferencia, y las partículas formadas de este modo (que contienen cada una una carga de ARN de interferencia

5 diferente) se administran por separado (por ejemplo, en diferentes momentos de acuerdo con un régimen terapéutico), o se combinan y administran juntas en una sola dosis unitaria (por ejemplo, con un vehículo farmacéuticamente aceptable). Las partículas lipídicas descritas en el presente documento son estables en suero, son resistentes a la degradación por nucleasas, y son sustancialmente no tóxicas para mamíferos, tales como seres humanos.

10 El lípido catiónico en las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI descritos en el presente documento o cualquier otra especie de lípido catiónico. En una realización particular, el lípido catiónico comprende 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-di- γ -linoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLinDMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), o una mezcla de los mismos.

15 El lípido no catiónico en las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos aniónicos y/o lípidos neutros. En algunas realizaciones, el lípido no catiónico comprende uno de los siguientes componentes de lípido neutro: (1) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo; (2) colesterol o un derivado del mismo; o (3) un fosfolípido. En determinadas realizaciones preferidas, el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), o una mezcla de los mismos. En una realización particularmente preferida, el lípido no catiónico es una mezcla de DPPC y colesterol.

20 En una realización particular, el componente de lípido no catiónico de la formulación de la partícula lipídica comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol (o un derivado del mismo). En determinados casos, la mezcla comprende: (i) un fosfolípido de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente un 25 % en moles a aproximadamente un 35 % en moles del lípido total presente en la partícula. En otra realización particular, el componente lipídico no catiónico es colesterol, un derivado del mismo, o una mezcla del mismo.

25 El conjugado lipídico en las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) inhibe la agregación de partículas y puede comprender, por ejemplo, uno o más de los conjugados lipídicos descritos en el presente documento. En una realización particular, el conjugado lipídico comprende un conjugado de PEG-lípido. Los ejemplos de conjugados de PEG-lípido incluyen, pero sin limitación, conjugados de PEG-DAG, conjugados de PEG-DAA, y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, el conjugado de PEG-DAA en la partícula lipídica puede comprender un conjugado de PEG-didéciloxipropilo (C₁₀), un conjugado de PEG-dilauroiloxipropilo (C₁₂), un conjugado de PEG-dimiristiloxipropilo (C₁₄), un conjugado de PEG-dipalmitiloxipropilo (C₁₆), un conjugado de PEG-diesteariloxipropilo (C₁₈), o mezclas de los mismos. En otra realización, el conjugado lipídico comprende un conjugado de POZ-lípido, tal como un conjugado de POZ-DAA. En realizaciones particulares, el conjugado lipídico (por ejemplo, conjugado de PEG-lípido) comprende de aproximadamente un 6 % en moles a aproximadamente un 8 % en moles del lípido total presente en la partícula.

30 El resto de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento pueden comprender un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 10.000 Dalton. En determinados casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton. En otros casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 250 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 400 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 600 Dalton a aproximadamente 900 Dalton, de aproximadamente 700 Dalton a aproximadamente 800 Dalton, o aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 Dalton. En una realización particular, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 750 Dalton. En algunas realizaciones, el grupo hidroxilo terminal del resto de PEG está sustituido con un grupo metilo. En una realización preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG750-C-DMA, en el que el "750" indica el peso molecular promedio del PEG, en el que la "C" indica un resto enlazador de carbamato, y en el que el "DMA" indica dimiristiloxipropilo.

35 En una realización particular, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) comprenden un sistema de cuatro componentes, en la que:

60 el lípido catiónico comprende de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles (por ejemplo, aproximadamente un 54 % en moles) del lípido total presente en la partícula, el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en el que el fosfolípido comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles (por ejemplo, aproximadamente un 7 % en moles) del lípido total presente en la partícula y el colesterol o el derivado del mismo comprende de aproximadamente un 25 % en moles a aproximadamente un 35 % en moles (por

ejemplo, aproximadamente un 32 % en moles) del lípido total presente en la partícula, y el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas (es decir, el conjugado lipídico) comprende de aproximadamente un 6 % en moles a aproximadamente un 8 % en moles (por ejemplo, aproximadamente un 7 % en moles) del lípido total presente en la partícula.

5 En aspectos ejemplares de esta realización, el lípido catiónico es DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("C2K"), el lípido no catiónico comprende una mezcla de un DPPC y colesterol, y el conjugado lipídico es un conjugado de PEG-lípido, tal como un conjugado de PEG750-DMA (por ejemplo, PEG750-C-DMA).

10 En otra realización particular, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) comprende un sistema de tres componentes que está libre de fosfolípidos, en la que:

15 el lípido catiónico comprende de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles (por ejemplo, aproximadamente un 58 % en moles) del lípido total presente en la partícula, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo, en el que el colesterol o el derivado del mismo comprende de aproximadamente un 30 % en moles a aproximadamente un 40 % en moles (por ejemplo, aproximadamente un 35 % en moles) del lípido total presente en la partícula, y el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas (es decir, el conjugado lipídico) comprende de aproximadamente un 6 % en moles a aproximadamente un 8 % en moles (por ejemplo, aproximadamente un 7 % en moles) del lípido total presente en la partícula.

20 En aspectos ejemplares de esta realización, el lípido catiónico es DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("C2K"), el lípido no catiónico es colesterol, y el conjugado lipídico es un conjugado de PEG-lípido, tal como un conjugado de PEG750-DMA (por ejemplo, PEG750-C-DMA).

25 En un aspecto preferido, en el presente documento se describe una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que comprende:

- 30 (a) un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNbc, tal como ARNpi);
- (b) un lípido catiónico que comprende aproximadamente un 54 % en moles del lípido total presente en la partícula;
- (c) un fosfolípido que comprende aproximadamente un 7 % en moles del lípido total presente en la partícula;
- (d) colesterol o un derivado del mismo que comprende aproximadamente un 32 % en moles del lípido total presente en la partícula; y
- 35 (e) un conjugado de PEG-lípido que comprende aproximadamente un 7 % en moles del lípido total presente en la partícula.

40 En otro aspecto preferido, en el presente documento se describe una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que comprende:

- (a) un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNbc, tal como ARNpi);
- (b) un lípido catiónico que comprende aproximadamente un 58 % en moles del lípido total presente en la partícula;
- 45 (c) colesterol o un derivado del mismo que comprende aproximadamente un 35 % en moles del lípido total presente en la partícula; y
- (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende aproximadamente un 7 % en moles del lípido total presente en la partícula.

50 Además, en el presente documento se describen composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula lipídica descrita en el presente documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido) y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 En otro aspecto, en el presente documento se describen métodos para introducir uno o más agentes activos, tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia) en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una partícula lipídica descrita en el presente documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido). En una realización particular, la célula es una célula tumoral, tal como, por ejemplo, una célula presente en un tumor sólido de un mamífero (por ejemplo, un ser humano). En algunos casos, el tumor sólido es un tumor hepático. En otros casos, el tumor sólido se localiza fuera del hígado. En determinadas realizaciones, la célula es una célula no tumoral presente en un mamífero que produce uno o más factores angiogénicos y/o de crecimiento asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, o la transformación celular.

60 En otro aspecto más, en el presente documento se describen métodos para el suministro *in vivo* de uno o más agentes activos, tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia) a tumores sólidos, comprendiendo el método administrar a un mamífero (por ejemplo, ser humano) una partícula lipídica descrita en el presente documento (por ejemplo, SNALP).

En un aspecto relacionado, en el presente documento se describen métodos para tratar el cáncer en un mamífero (por ejemplo, ser humano) que lo necesita, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula lipídica (por ejemplo, SNALP) que comprende uno o más agentes activos, tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia).

5 Tal como se describe en los ejemplos más adelante, las partículas lipídicas, tales como las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) pueden suministrar preferencialmente una carga, tal como un ARN de interferencia, a tumores sólidos en comparación con otros tejidos, por ejemplo, para el tratamiento del cáncer. En una realización particular, el tumor sólido es un tumor hepático. En otra realización particular, el tumor sólido se localiza fuera del hígado.

10 En algunas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) se administran mediante una de las siguientes rutas de administración: oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, e intradérmica. En realizaciones particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido se administran por vía sistémica, por ejemplo, por las rutas de administración entéricas o parenterales.

15 En un aspecto particular, en el presente documento se describen métodos para introducir un ARN de interferencia, tal como un ARNpi que silencia la expresión de un gen asociado con la proliferación celular, la tumorigénesis, o la transformación celular en una célula tumoral de un mamífero, comprendiendo el método administrar al mamífero una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, SNALP), en el que el ARNpi se introduce preferencialmente en la célula tumoral en comparación con otras células. En determinadas realizaciones, la célula tumoral está presente en un tumor sólido de un mamífero, tal como un ser humano. En algunos casos, el tumor sólido es un tumor hepático. En otros casos, el tumor sólido se localiza fuera del hígado. En otras realizaciones determinadas, el ARNpi también puede introducirse (por ejemplo, preferencialmente) en células no tumorales presentes en un mamífero que producen uno o más factores angiogénicos y/o de crecimiento asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, o la transformación celular.

20 En algunas realizaciones, en el presente documento se describen métodos para tratar un trastorno de la proliferación celular, tal como cáncer, mediante la administración de un ácido nucleico, tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) en partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP), solo o en combinación con un fármaco quimioterapéutico. Los métodos pueden llevarse a cabo *in vitro* usando técnicas de cultivo tisular convencionales o *in vivo* mediante la administración del ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) usando cualquier medio conocido en la técnica. En realizaciones preferidas, el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) se suministra a una célula cancerosa en un mamífero, tal como un ser humano, solo o en combinación con un fármaco quimioterapéutico. Las partículas de ácido nucleico-lípido y/o los fármacos quimioterapéuticos también pueden administrarse conjuntamente con agentes hormonales, inmunoterapéuticos y/o radioterapéuticos.

25 En realizaciones particulares, la molécula de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) silencia la expresión de un gen asociado con la proliferación celular, la tumorigénesis, o la transformación celular. Los ejemplos no limitantes de genes diana de oncología adecuados se proporcionan en el presente documento. En una realización ejemplar preferida, el ARNpi silencia la expresión génica de la cinasa 1 similar a polo (PLK-1). Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen de PLK-1 incluyen aquellos descritos en el presente documento y en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20050107316 y 20070265438, y la Publicación PCT n.º WO 09/082817. Se describen realizaciones adicionales relacionadas con el tratamiento de un trastorno de la proliferación celular usando una partícula lipídica en, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20090149403, la Publicación PCT n.º WO 09/129319, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/245.143, presentada el 23 de septiembre de 2009.

30 Las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) son útiles para el suministro terapéutico de moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) que silencian la expresión de uno o más genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, o la transformación celular (por ejemplo, PLK-1). En algunas realizaciones, se formula un cóctel de ARNpi que se dirigen a uno o más genes expresados en células tumorales en las mismas o diferentes partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP), y las partículas se administran a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) que requiere dicho tratamiento. En determinados casos, puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz de las partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) al mamífero, por ejemplo, para tratar, prevenir, reducir el riesgo de desarrollar, o retrasar la aparición del cáncer, por ejemplo, dirigiéndose preferencialmente a un tumor sólido.

35 Tal como se describe en los ejemplos más adelante, se ha descubierto sorprendentemente que las formulaciones de SNALP descritas en el presente documento que contienen al menos un lípido catiónico de las fórmulas I-XVI (ya sea solo o en combinación con otros lípidos catiónicos) y al menos un ARN de interferencia tal como se describe en el presente documento, muestran una potencia aumentada (es decir, una actividad de silenciamiento aumentada) y/o una tolerabilidad aumentada (por ejemplo, un perfil de toxicidad más favorable) cuando se dirigen a un gen de interés en una célula tumoral, tal como PLK-1, cuando se comparan con otras formulaciones de SNALP. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, en el presente documento se describen métodos para tratar una enfermedad o

trastorno asociado con la sobreexpresión de PLK-1 en un mamífero (por ejemplo, ser humano) que lo necesita, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula lipídica (por ejemplo, SNALP) que comprende una o más moléculas de ARN de interferencia que silencian la expresión de PLK-1. Las enfermedades y trastornos asociados con la sobreexpresión de PLK-1 se describen en el presente documento e incluyen, pero sin limitación, trastornos de la proliferación celular, tales como el cáncer.

En algunas realizaciones, las moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritas en el presente documento se usan en métodos para silenciar la expresión génica de PLK-1, por ejemplo, en una célula, tal como una célula tumoral. En particular, en el presente documento se describen métodos para tratar, prevenir, reducir el riesgo de desarrollar, o retrasar la aparición de un trastorno de la proliferación celular en un mamífero regulando negativamente o silenciando la transcripción y/o la traducción del gen PLK-1. En determinadas realizaciones, en el presente documento se describe un método para introducir una o más moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritas en el presente documento en una célula poniendo en contacto la célula con una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, una formulación de SNALP). En una realización particular, la célula es una célula tumoral, tal como, por ejemplo, una célula presente en tejido de tumor sólido de un mamífero (por ejemplo, un ser humano). En otra realización, la presente invención proporciona un método para el suministro *in vivo* de una o más moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritas en el presente documento a una célula tumoral mediante la administración a un mamífero (por ejemplo, ser humano) de una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, una formulación de SNALP).

En algunas realizaciones, las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) se administran mediante una de las siguientes rutas de administración: oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea, e intradérmica. En realizaciones particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido se administran por vía sistémica, por ejemplo, por las rutas de administración entéricas o parenterales.

En determinados aspectos, en el presente documento se describen métodos para silenciar la expresión génica de PLK-1 en un mamífero (por ejemplo, ser humano) que lo necesita, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, una formulación de SNALP) que comprende uno o más ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritos en el presente documento (por ejemplo, uno o más ARNpi que se dirigen al gen PLK-1). En algunas realizaciones, la administración de partículas de ácido nucleico que comprenden uno o más ARNpi descritos en el presente documento reduce los niveles de ARNm del gen diana (por ejemplo, en un ser humano o en un modelo animal, tal como un modelo de ratón o un modelo de mono) en al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% (o cualquier intervalo intermedio) en relación a los niveles de ARNm del gen diana detectados en ausencia del ARNpi (por ejemplo, control de tampón o control de ARNpi no relevante). En otras realizaciones, la administración de partículas de ácido nucleico que comprenden uno o más ARNpi descritos en el presente documento reduce los niveles de ARNm del gen diana (por ejemplo, en un ser humano o en un modelo animal, tal como un modelo de ratón o un modelo de mono) durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 días o más (o cualquier intervalo intermedio) en relación a un control negativo, tal como, por ejemplo, un control de tampón o un control de ARNpi no relevante.

En otros aspectos concretos, en el presente documento se describen métodos para tratar, prevenir, reducir el riesgo o las probabilidades de desarrollar (por ejemplo, reducir la susceptibilidad a), retrasar el inicio de, y/o aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno de la proliferación celular en un mamífero (por ejemplo, ser humano) que lo necesita, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, una formulación de SNALP) que comprende una o más moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritas en el presente documento (por ejemplo, uno o más ARNpi que se dirigen al gen PLK-1).

En un aspecto relacionado, en el presente documento se describe un método para tratar y /o aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno de la proliferación celular, tal como el cáncer, en un mamífero (por ejemplo, ser humano) que lo necesita, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, una formulación de SNALP) que comprende uno o más ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritos en el presente documento (por ejemplo, uno o más ARNpi que se dirigen al gen PLK-1). En algunas realizaciones, la administración de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden una o más moléculas de ARNpi descritas en el presente documento reduce el tamaño y/o el volumen tumoral (por ejemplo, en un ser humano o en un modelo animal, tal como un modelo de ratón o un modelo de mono) en al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o un 100% (o cualquier intervalo intermedio) en relación al tamaño y/o volumen tumoral detectado en ausencia del ARNpi (por ejemplo, control de tampón o control de ARNpi no relevante).

En otro aspecto relacionado, en el presente documento se describe un método para reducir el riesgo o la

probabilidad de desarrollar (por ejemplo, reducir la susceptibilidad para) un trastorno de la proliferación celular, tal como el cáncer, en un mamífero (por ejemplo, ser humano) en riesgo de desarrollar el trastorno de la proliferación celular, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, una formulación de SNALP) que comprende uno o más ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritos en el presente documento (por ejemplo, uno o más ARNpi que se dirigen al gen PLK-1). En algunas realizaciones, la administración de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden una o más moléculas de ARNpi descritas en el presente documento reduce el riesgo o la probabilidad de desarrollar un trastorno de la proliferación celular (por ejemplo, en un ser humano o en un modelo animal, tal como un modelo de ratón o un modelo de mono) en al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o en un 100% (o cualquier intervalo intermedio) en relación al riesgo o la probabilidad de desarrollar el trastorno de la proliferación celular en ausencia del ARNpi (por ejemplo, control de tampón o control de ARNpi no relevante).

En otro aspecto relacionado más, en el presente documento se describe un método para prevenir o retrasar la aparición de un trastorno de la proliferación celular, tal como un cáncer, en un mamífero (por ejemplo, ser humano) en riesgo de desarrollar el trastorno de la proliferación celular, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, una formulación de SNALP) que comprende uno o más ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) descritos en el presente documento (por ejemplo, uno o más ARNpi que se dirigen al gen PLK-1).

IV. Partículas lipídicas

Las partículas lipídicas descritas en el presente documento comprenden típicamente un agente activo o agente terapéutico, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas. En algunas realizaciones, el agente activo o el agente terapéutico está completamente encapsulado dentro de la parte lipídica de la partícula lipídica, de tal forma que el agente activo o el agente terapéutico en la partícula lipídica es resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, por ejemplo, por una nucleasa o proteasa. En otras realizaciones, las partículas lipídicas descritas en el presente documento son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos, tales como los seres humanos. Las partículas lipídicas de la invención tienen típicamente un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, o de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm. Las partículas lipídicas de la invención tienen una proporción de lípido:agente terapéutico (por ejemplo, lípido:ácido nucleico) (proporción en masa/masa) de desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 100:1, desde aproximadamente 1:1 a aproximadamente 50:1, desde aproximadamente 2:1 a aproximadamente 25:1, desde aproximadamente 3:1 a aproximadamente 20:1, desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1, o desde aproximadamente 5:1 a aproximadamente 10:1.

Las partículas lipídicas incluyen, pero sin limitación, vesículas lipídicas, tales como liposomas. Tal como se usa en el presente documento, una vesícula lipídica incluye una estructura que tiene membranas que contienen lípido que encierran un interior acuoso. En realizaciones particulares, se usan vesículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos descritos en el presente documento para encapsular ácidos nucleicos dentro de las vesículas lipídicas. En otras realizaciones, se complejan vesículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos descritos en el presente documento con ácidos nucleicos para formar lipocomplejos.

En realizaciones preferidas, las partículas lipídicas descritas en el presente documento son partículas de ácido nucleico-lípido (SNALP) estables en suero que comprenden un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNbc, tal como ARNpi, ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNai, y/o miARN), un lípido catiónico (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o sales de los mismos, tal como se expone en el presente documento), un lípido no catiónico (por ejemplo, mezclas de uno o más fosfolípidos y colesterol), y un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido). La SNALP puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más ARN de interferencia no modificados y/o modificados (por ejemplo, ARNpi) que se dirigen a uno o más de los genes descritos en el presente documento. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen en, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.753.613; 5.785.992; 5.705.385; 5.976.567; 5.981.501; 6.110.745; y 6.320.017; y la Publicación PCT n.º WO 96/40964.

En las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en el presente documento, el ácido nucleico puede encapsularse completamente dentro de la porción lipídica de la partícula, protegiendo de este modo al ácido nucleico frente a la degradación por nucleasas. En realizaciones preferidas, una SNALP que comprende un ácido nucleico, tal como un ARN de interferencia, está completamente encapsulada dentro de la porción lipídica de la partícula, protegiendo de este modo al ácido nucleico frente a la degradación por nucleasas. En determinados casos, el ácido nucleico en la SNALP no se degrada sustancialmente después de la exposición de la partícula a una nucleasa a 37°C durante al menos aproximadamente 20, 30, 45, o 60 minutos. En otros casos determinados, el ácido nucleico en la SNALP no se degrada sustancialmente después de la incubación de la partícula en suero a 37°C durante al menos aproximadamente 30, 45, o 60 minutos o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, o 36 horas. En otras realizaciones, el ácido nucleico está en complejo con la porción lipídica

de la partícula. Uno de los beneficios de las formulaciones descritas en el presente documento es que las composiciones de partícula de ácido nucleico-lípido son sustancialmente no tóxicas para mamíferos, tales como seres humanos.

5 La expresión "completamente encapsulado" indica que el ácido nucleico en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada significativamente después de la exposición a suero o un ensayo de nucleasa que podría degradar de manera significativa el ADN o ARN libre. En un sistema completamente encapsulado, se degrada preferentemente menos de aproximadamente un 25% del ácido nucleico en la partícula en un tratamiento que normalmente podría degradar el 100% del ácido nucleico libre, más preferentemente, menos de aproximadamente el 10%, y lo más
10 preferentemente, se degrada menos de aproximadamente el 5% del ácido nucleico. "Completamente encapsulado" también indica que las partículas de ácido nucleico-lípido son estables en suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras su administración *in vivo*.

15 En el contexto de los ácidos nucleicos, puede determinarse la encapsulación completa efectuando un ensayo de exclusión de colorante fluorescente impermeable a membranas, que usa un colorante que tiene una fluorescencia potenciada cuando se asocia con ácido nucleico. Los colorantes específicos, tales como OliGreen® y RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) están disponibles para la determinación cuantitativa del ADN plasmídico, desoxirribonucleótidos monocatenarios, y/o ribonucleótidos mono o bicatenarios. La encapsulación se determina añadiendo el colorante a una formulación liposómica, midiendo la fluorescencia resultante, y comparándola con la
20 fluorescencia observada tras la adición de una pequeña cantidad de detergente no iónico. La rotura mediada por detergente de la bicapa liposómica libera el ácido nucleico encapsulado, permitiéndole interactuar con el colorante impermeable a la membrana. La encapsulación del ácido nucleico puede calcularse como $E = (I_0 - I)/I_0$, donde I e I_0 se refieren a las intensidades de fluorescencia antes y después de la adición del detergente (véase, Wheeler et al., Gene Ther., 6:271-281 (1999)).

25 En otras realizaciones, en el presente documento se describe una composición de partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) que comprende una diversidad de partículas de ácido nucleico-lípido.

30 En algunos casos, la composición de SNALP comprende ácido nucleico que está completamente encapsulado dentro de la porción lipídica de las partículas, de tal forma que de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 90% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 95%,
35 de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 90% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) de las partículas tienen el ácido nucleico encapsulado en las mismas.

45 En otros casos, la composición de SNALP comprende ácido nucleico que está completamente encapsulado dentro de la porción lipídica de las partículas, de tal forma que de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 90% a aproximadamente un 100%, de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 85% a aproximadamente un 95%,
50 de aproximadamente un 90% a aproximadamente un 95%, de aproximadamente un 30% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 40% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 50% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 60% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 70% a aproximadamente un 90%, de aproximadamente un 80% a aproximadamente un 90%, o al menos aproximadamente un 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del ácido nucleico introducido está encapsulado en las partículas.

60 Dependiendo del uso previsto de las partículas lipídicas descritas en el presente documento, pueden variarse las proporciones de los componentes y puede medirse la eficacia del suministro de una formulación particular usando, por ejemplo, un ensayo de parámetro de liberación endosómica (ERP).
65

En realizaciones particulares, en el presente documento se describe una composición de partícula lipídica (por ejemplo, SNALP) que comprende una diversidad de partículas lipídicas descritas en el presente documento y un antioxidante. En determinados casos, el antioxidante en la composición de partícula lipídica reduce, previene, y/o inhibe la degradación de un lípido catiónico presente en la partícula lipídica. En los casos en los que el agente activo es un ácido nucleico terapéutico, tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi), el antioxidante en la composición de partícula lipídica reduce, previene, y/o inhibe la degradación de la carga de ácido nucleico, por ejemplo, reduciendo, previniendo, y/o inhibiendo la formación de aductos entre el ácido nucleico y el lípido catiónico. Los ejemplos no limitantes de antioxidantes incluyen antioxidantes hidrófilos, tales como agentes quelantes (por ejemplo, quelantes de metales, tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato, y similares), antioxidantes lipófilos (por ejemplo, isómeros de la vitamina E, polifenoles, y similares), sales de los mismos; y mezclas de los mismos. En caso necesario, el antioxidante está presente típicamente en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir, y/o reducir la degradación del lípido catiónico y/o el agente activo presente en la partícula, por ejemplo, al menos aproximadamente 20 mM de EDTA o una sal del mismo, o al menos aproximadamente 100 mM de citrato o una sal del mismo. Puede incluirse un antioxidante, tal como EDTA y/o citrato en cualquier etapa o en múltiples etapas del proceso de formación de la partícula lipídica descrito en la sección V (por ejemplo, antes de, durante, y/o después de la formación de la partícula lipídica).

Las realizaciones adicionales relacionadas con métodos para prevenir la degradación de lípidos catiónicos y/o agentes activos (por ejemplo, ácidos nucleicos terapéuticos) presentes en partículas lipídicas, composiciones que comprenden partículas lipídicas estabilizadas mediante estos métodos, métodos para producir estas partículas lipídicas, y los métodos para suministrar y/o administrar estas partículas lipídicas se describen en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/265.671, titulada "SNALP Formulations Containing Antioxidants", presentada el 1 de diciembre de 2009.

25 A. Agentes activos

Los agentes activos (por ejemplo, agentes terapéuticos) incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado en una célula, tejido, órgano, o sujeto. Dichos efectos pueden ser, por ejemplo, biológicos, fisiológicos, y/o cosméticos. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto incluyendo, pero sin limitación, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, moléculas pequeñas, y mezclas de los mismos. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNbc, tal como ARNpi, ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNai, y/o miARN), oligonucleótidos antisentido, plásmidos, ribozimas, oligonucleótidos inmunoestimuladores, y mezclas de los mismos. Los ejemplos de péptidos o polipéptidos incluyen, sin limitación, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes, y/o anticuerpos Primatect™), citocinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de la diferenciación, receptores de la superficie celular y sus ligandos, hormonas, y mezclas de los mismos. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero sin limitación, moléculas o compuestos orgánicos pequeños, tal como cualquier agente o fármaco convencional conocido por los expertos en la materia.

En algunas realizaciones, el agente activo es un agente terapéutico, o una sal o derivado del mismo. Los derivados de agentes terapéuticos pueden ser terapéuticamente activos por sí mismos o pueden ser profármacos, que se vuelven activos tras su modificación adicional. Por lo tanto, en una realización, un derivado de agente terapéutico mantiene la totalidad o parte de la actividad terapéutica en comparación con el agente no modificado, mientras que en otra realización, un derivado de agente terapéutico es un profármaco que carece de actividad terapéutica, pero que se vuelve activo tras su modificación adicional.

1. Ácidos nucleicos

En determinadas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en el presente documento se asocian con un ácido nucleico, dando como resultado una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP). En algunas realizaciones, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "ácido nucleico" incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido, denominándose oligonucleótidos los fragmentos que contienen hasta 60 nucleótidos, y denominándose polinucleótidos los fragmentos de mayor longitud. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos tienen de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede administrarse solo en las partículas lipídicas, o en combinación (por ejemplo, administrarse conjuntamente) con partículas lipídicas que comprenden péptidos, polipéptidos, o moléculas pequeñas, tales como fármacos convencionales. De forma análoga, cuando se usan para tratar un trastorno de la proliferación celular, tal como el cáncer, el ácido nucleico, tal como la molécula de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi), puede administrarse sola o administrarse conjuntamente (es decir, de manera concurrente o consecutiva) con agentes convencionales usados para tratar, por ejemplo, un trastorno de la proliferación celular, tal como el cáncer. Dichos agentes incluyen fármacos quimioterapéuticos así como agentes hormonales, inmunoterapéuticos y/o radioterapéuticos convencionales.

En el contexto de la presente invención, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consiste en bases de origen natural, azúcares y enlaces

entre azúcares (armazón). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros de origen no natural, o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren normalmente frente a las formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, inmunogenicidad reducida, y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas.

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

El ácido nucleico que está presente en una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en el presente documento incluye cualquier forma de ácido nucleico que se conozca. Los ácidos nucleicos usados en el presente documento pueden ser ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario, o híbridos de ADN-ARN. En realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos son ARN bicatenario. Los ejemplos de ARN bicatenario se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, ARNpi y otros agentes de iARN, tales como ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNai, y pre-miARN. En otras realizaciones preferidas, los ácidos nucleicos son ácidos nucleicos monocatenarios. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, miARN maduro, y oligonucleótidos formadores de tripletes. En realizaciones adicionales, los ácidos nucleicos son ADN bicatenario. Los ejemplos de ADN bicatenario incluyen, por ejemplo, híbridos de ADN-ADN que comprenden una hebra codificante de ADN y una hebra no codificante de ADN, tal como se describen en la Publicación PCT n.º WO 2004/104199.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento pueden tener diversas longitudes, generalmente dependientes de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden tener de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 restos de nucleótido de longitud. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden tener una longitud en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos. En diversas realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, tanto monocatenarios, bicatenarios, y tricatenarios, pueden tener una longitud en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

En realizaciones particulares, un oligonucleótido (o una hebra del mismo) descrito en el presente documento hibrida específicamente con o es complementario a una secuencia de polinucleótido diana. Las expresiones "hibridable de manera específica" y "complementario", tal como se usan en el presente documento, indican un grado de complementariedad suficiente, de tal forma que se produce una unión estable y específica entre la diana de ADN o ARN y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser un 100% complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para que pueda hibridarse de manera específica. En realizaciones preferidas, un oligonucleótido es hibridable de manera específica cuando la unión del oligonucleótido a la secuencia diana interfiere con la función normal de la secuencia diana para causar una pérdida de utilidad o expresión de la misma, y existe un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del oligonucleótido a las secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o de tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos. Por lo tanto, el oligonucleótido puede incluir 1, 2, 3, o más sustituciones de bases en comparación con la región de un gen o secuencia de ARNm a la que se dirige o con la que hibrida de manera específica.

a) ARNpi

El componente de ARNpi de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en el presente documento es capaz de silenciar la expresión de un gen diana de interés, tal como PLK-1. Cada hebra de los dúplex de ARNpi tiene típicamente de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En determinadas realizaciones, el ARNpi comprende al menos un nucleótido modificado. El ARNpi es generalmente menos inmunoestimulador que una secuencia de ARNpi no modificada correspondiente y mantiene la actividad de iARN contra el gen diana de interés. En algunas realizaciones, el ARNpi modificado contiene al menos un nucleótido de purina o pirimidina de 2'OMe, tal como un nucleótido de 2'OMe-guanosina, 2'OMe-uridina, 2'OMe-adenosina, y/o 2'OMe-citosina. Los nucleótidos modificados pueden estar presentes en una hebra (es decir, codificante o no codificante) o en ambas hebras del ARNpi. En algunas realizaciones preferidas descritas en el presente documento, se modifican uno o más de los nucleótidos de uridina y/o guanosina (por ejemplo, modificados con 2'OMe) en una hebra (es decir, codificante o no codificante) o en ambas hebras del ARNpi. En estas realizaciones, el ARNpi puede comprender además uno o más nucleótidos de adenosina modificados (por ejemplo, modificados con 2'OMe) y/o de citosina modificados (por ejemplo, modificados con 2'OMe). En otras realizaciones preferidas, solo se modifican nucleótidos de uridina y/o guanosina (por ejemplo, modificados con 2'OMe) en una hebra (es decir, codificante o no codificante) o en ambas hebras del ARNpi. Las secuencias de ARNpi pueden tener salientes (por ejemplo, salientes 3' o 5', tal como se

describen en Elbashir et al., Genes Dev., 15:188 (2001) o Nykänen et al., Cell, 107:309 (2001)), o pueden carecer de salientes (es decir, tienen extremos romos).

5 En realizaciones particulares descritas en el presente documento, la incorporación selectiva de nucleótidos modificados, tales como nucleótidos de uridina y/o guanosina de 2'OMe en la región bicatenaria de una cualquiera o ambas hebras del ARNpi reduce o suprime completamente la respuesta inmunitaria a esa molécula de ARNpi. En determinados casos, pueden equilibrarse u optimizarse las propiedades inmunoestimulantes de secuencias de ARNpi específicas y su capacidad para silenciar la expresión génica mediante la introducción de modificaciones de 2'OMe mínimas y selectivas dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNpi. Esto puede lograrse a dosis de
10 ARNpi terapéuticamente viables sin inducción de citocinas, toxicidad, y efectos fuera de la diana con el uso de ARNpi no modificado.

15 El ARNpi modificado descrito en el presente documento comprende generalmente de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 100% (por ejemplo, aproximadamente un 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, o 100%) de nucleótidos modificados en la región bicatenaria del dúplex de ARNpi. En determinadas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos modificados. En otras realizaciones determinadas, algunos o todos los nucleótidos modificados en la región bicatenaria del ARNpi se encuentran a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más nucleótidos de distancia entre sí. En una realización preferida, ninguno de los nucleótidos modificados en la región bicatenaria del ARNpi se encuentran adyacentes entre sí (por ejemplo, existe un hueco de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 nucleótidos no modificados entre cada nucleótido modificado). En otra realización preferida, al menos dos de los nucleótidos modificados en la región bicatenaria del ARNpi se encuentran adyacentes entre sí (por ejemplo, no hay nucleótidos no modificados entre dos o más
25 nucleótidos modificados). En otras realizaciones preferidas, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco de los nucleótidos modificados en la región bicatenaria del ARNpi se encuentran adyacentes entre sí.

30 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, menos de aproximadamente el 50% (por ejemplo, menos de aproximadamente un 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, o 36%, preferentemente menos de aproximadamente un 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, o 30%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'OMe). En un aspecto de estas realizaciones, menos de aproximadamente el 50% de los nucleótidos de uridina y/o guanosina en la región bicatenaria de una o ambas hebras del ARNpi se modifican de manera selectiva (por ejemplo, de manera única). En otro aspecto de estas realizaciones, menos de aproximadamente el 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi, en los que el ARNpi comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido de 2'OMe-uridina, y en los que los nucleótidos de 2'OMe-guanosina y los nucleótidos de 2'OMe-uridina son los únicos nucleótidos de 2'OMe presentes en la región bicatenaria. En otro aspecto más de estas realizaciones, menos de aproximadamente el 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi modificado, en donde el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe seleccionados entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, y mezclas de los mismos, y en los que el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina en la región bicatenaria. En un aspecto adicional de estas realizaciones, menos de aproximadamente el 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi, en los que el ARNpi comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido de 2'OMe-uridina, y en los que el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina en la región bicatenaria. En otro aspecto de estas realizaciones, menos de aproximadamente el 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi modificado, en donde el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe seleccionados entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, y mezclas de los mismos, y en los que los nucleótidos de 2'OMe en la región bicatenaria no se encuentran adyacentes entre sí.

55 En otras realizaciones descritas en el presente documento, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% (por ejemplo, aproximadamente un 5%-50%, 10%-50%, 15%-50%, 20%-50%, 25%-50%, 30%-50%, 35%-50%, 40%-50%, 45%-50%, 5%-45%, 10%-45%, 15%-45%, 20%-45%, 25%-45%, 30%-45%, 35%-45%, 40%-45%, 5%-40%, 10%-40%, 15%-40%, 20%-40%, 25%-40%, 25%-39%, 25%-38%, 25%-37%, 25%-36%, 26%-39%, 26%-38%, 26%-37%, 26%-36%, 27%-39%, 27%-38%, 27%-37%, 27%-36%, 28%-39%, 28%-38%, 28%-37%, 28%-36%, 29%-39%, 29%-38%, 29%-37%, 29%-36%, 30%-40%, 30%-39%, 30%-38%, 30%-37%, 30%-36%, 31%-39%, 31%-38%, 31%-37%, 31%-36%, 32%-39%, 32%-38%, 32%-37%, 32%-36%, 33%-39%, 33%-38%, 33%-37%, 33%-36%, 34%-39%, 34%-38%, 34%-37%, 34%-36%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 21%-35%, 22%-35%, 23%-35%, 24%-35%, 25%-35%, 26%-35%, 27%-35%, 28%-35%, 29%-35%, 30%-35%, 31%-35%, 32%-35%, 33%-35%, 34%-35%, 30%-34%, 31%-34%, 32%-34%, 33%-34%, 30%-33%, 31%-33%, 32%-33%, 30%-32%, 31%-32%, 25%-34%, 25%-33%, 25%-32%, 25%-31%, 26%-34%, 26%-33%, 26%-32%, 26%-31%, 27%-34%, 27%-33%, 27%-32%, 27%-31%, 28%-34%, 28%-33%, 28%-32%, 28%-31%, 29%-34%, 29%-33%, 29%-32%, 29%-31%, 5%-30%, 10%-
60 37%, 26%-36%, 27%-39%, 27%-38%, 27%-37%, 27%-36%, 28%-39%, 28%-38%, 28%-37%, 28%-36%, 29%-39%, 29%-38%, 29%-37%, 29%-36%, 30%-40%, 30%-39%, 30%-38%, 30%-37%, 30%-36%, 31%-39%, 31%-38%, 31%-37%, 31%-36%, 32%-39%, 32%-38%, 32%-37%, 32%-36%, 33%-39%, 33%-38%, 33%-37%, 33%-36%, 34%-39%, 34%-38%, 34%-37%, 34%-36%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 21%-35%, 22%-35%, 23%-35%, 24%-35%, 25%-35%, 26%-35%, 27%-35%, 28%-35%, 29%-35%, 30%-35%, 31%-35%, 32%-35%, 33%-35%, 34%-35%, 30%-34%, 31%-34%, 32%-34%, 33%-34%, 30%-33%, 31%-33%, 32%-33%, 30%-32%, 31%-32%, 25%-34%, 25%-33%, 25%-32%, 25%-31%, 26%-34%, 26%-33%, 26%-32%, 26%-31%, 27%-34%, 27%-33%, 27%-32%, 27%-31%, 28%-34%, 28%-33%, 28%-32%, 28%-31%, 29%-34%, 29%-33%, 29%-32%, 29%-31%, 5%-30%, 10%-
65

30%, 15%-30%, 20%-34%, 20%-33%, 20%-32%, 20%-31%, 20%-30%, 21%-30%, 22%-30%, 23%-30%, 24%-30%, 25%-30%, 25%-29%, 25%-28%, 25%-27%, 25%-26%, 26%-30%, 26%-29%, 26%-28%, 26%-27%, 27%-30%, 27%-29%, 27%-28%, 28%-30%, 28%-29%, 29%-30%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-29%, 20%-28%, 20%-27%, 20%-26%, 20%-25%, 5%-20%, 10%-20%, 15%-20%, 5%-15%, 10%-15%, o 5%-10%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos modificados. En un aspecto de estas realizaciones, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% de los nucleótidos de uridina y/o guanosina en la región bicatenaria de una o ambas hebras del ARNpi se modifican de manera selectiva (por ejemplo, de manera única). En otro aspecto de estas realizaciones, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi, en los que el ARNpi comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido de 2'OMe-uridina, y en los que los nucleótidos de 2'OMe-guanosina y los nucleótidos de 2'OMe-uridina son los únicos nucleótidos de 2'OMe presentes en la región bicatenaria. En otro aspecto más de estas realizaciones, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi modificado, en donde el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe seleccionados entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, y mezclas de los mismos, y en los que el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina en la región bicatenaria. En un aspecto adicional de estas realizaciones, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi, en los que el ARNpi comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido de 2'OMe-uridina, y en los que el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina en la región bicatenaria. En otro aspecto de estas realizaciones, de aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos de 2'OMe, en los que el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe en ambas hebras del ARNpi modificado, en donde el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe seleccionados entre el grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, y mezclas de los mismos, y en los que los nucleótidos de 2'OMe en la región bicatenaria no se encuentran adyacentes entre sí.

En determinadas realizaciones, el componente de ARNpi de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) comprende un dúplex de ARNpi asimétrico tal como se describe en la Publicación PCT n.º WO 2004/078941, que comprende una región bicatenaria que consiste en una hebra codificante de ADN y una hebra no codificante de ARN (por ejemplo, un híbrido de ADN-ARN), en el que se coloca un agente de bloqueo en el dúplex de ARNpi. En algunos casos, el dúplex de ARNpi asimétrico puede modificarse químicamente tal como se describe en el presente documento. Otros ejemplos no limitantes de dúplex de ARNpi asimétricos se describen en la Publicación PCT n.º WO 2006/074108, que divulga oligonucleótidos autoprotectidos que comprenden una región que tiene una secuencia complementaria a una, dos, tres, o más secuencias de ARNm diana iguales o diferentes (por ejemplo, ARNpi multivalentes) y una o más regiones autocomplementarias. Otros ejemplos no limitantes más de dúplex de ARNpi asimétricos se describen en la Publicación PCT n.º WO 2009/076321, que divulga polinucleótidos precursores asimétricos autoformantes que comprenden una región de direccionamiento que comprende una secuencia de polinucleótido complementaria a una región de una, dos, tres, o más secuencias de ARNm diana iguales o diferentes (por ejemplo, ARNpi multivalentes); una primera región autocomplementaria; y una segunda región autocomplementaria, en los que las regiones autocomplementarias primera y segunda se ubican una en cada extremo de la región de direccionamiento y ambas regiones autocomplementarias forman estructuras de tallo-bucle, en las que la primera región autocomplementaria puede escindirse por una endorribonucleasa RNasa III que no es una endorribonucleasa DICER de clase IV, y en las que ambas regiones autocomplementarias comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de la secuencia del gen diana, pero en la que una porción de la secuencia diana presente en la región de direccionamiento no tiene una secuencia complementaria en una cualquiera de las regiones autocomplementarias.

Los intervalos, porcentajes y patrones de modificaciones adicionales que pueden introducirse en los ARNpi se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20070135372.

(1) Selección de secuencias de ARNpi

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

A modo de ejemplo no limitante, puede escanearse respecto de secuencias de dinucleótidos la secuencia de nucleótido 3' del codón de inicio AUG de un transcrito a partir del gen diana de interés (por ejemplo, AA, NA, CC, GG, o UU, en las que N = C, G, o U) (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001)). Los nucleótidos inmediatamente 3' respecto de las secuencias de nucleótido se identifican como secuencias potenciales de ARNpi (es decir, una secuencia diana o una secuencia de hebra codificante). Típicamente, los 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, o más nucleótidos inmediatamente 3' respecto de las secuencias de nucleótido se identifican como secuencias potenciales de ARNpi. En algunas realizaciones, la secuencia de dinucleótido es una secuencia de AA o

NA y los 19 nucleótidos inmediatamente 3' respecto del dinucleótido AA o NA se identifican como secuencias de ARNpi potenciales. Las secuencias de ARNpi están normalmente espaciadas en diferentes posiciones a lo largo de la longitud del gen diana. Para potenciar adicionalmente la eficacia de silenciamiento de las secuencias de ARNpi, pueden analizarse las secuencias de ARNpi potenciales para identificar sitios que no contienen regiones de homología con otras secuencias codificantes, por ejemplo, en la célula u organismo diana. Por ejemplo, una secuencia de ARNpi adecuada de aproximadamente 21 pares de base no tendrá típicamente más de 16-17 pares de bases contiguos con homología con secuencias codificantes en la célula u organismo diana. En caso de que las secuencias de ARNpi se vayan a expresar a partir de un promotor de ARN Pol III, se seleccionan secuencias de ARNpi que carezcan de más de 4 A o T contiguas.

Una vez que se ha identificado una secuencia potencial de ARNpi, puede diseñarse una secuencia complementaria (es decir, una secuencia de hebra no codificante). También puede analizarse una secuencia de ARNpi potencial usando una diversidad de criterios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para potenciar su eficacia de silenciamiento, pueden analizarse las secuencias de ARNpi mediante un algoritmo de diseño racional para identificar secuencias que tienen una o más de las siguientes características: (1) un contenido de G/C de aproximadamente el 25% a aproximadamente el 60% de G/C; (2) al menos 3 A/U en las posiciones 15-19 de la hebra codificante; (3) ninguna repetición interna; (4) una A en la posición 19 de la hebra codificante; (5) una A en la posición 3 de la hebra codificante; (6) una U en la posición 10 de la hebra codificante; (7) ninguna G/C en la posición 19 de la hebra codificante; y (8) ninguna G en la posición 13 de la hebra codificante. Pueden hallarse herramientas de diseño de ARNpi que incorporan algoritmos que asignan valores adecuados de cada una de estas características y son útiles para la selección del ARNpi en, por ejemplo, <http://ihome.ust.hk/~bokcmho/siRNA/siRNA.html>. Un experto en la materia apreciará que pueden seleccionarse secuencias con una o más de las características anteriores para su análisis y ensayo adicional como potenciales secuencias de ARNpi.

Además, a menudo pueden eliminarse como ARNpi secuencias potenciales de ARNpi con uno o más de los siguientes criterios: (1) secuencias que comprenden una serie de 4 o más bases iguales seguidas; (2) secuencias que comprenden homopolímeros de G (es decir, para reducir los posibles efectos no específicos debido a las características estructurales de estos polímeros); (3) secuencias que comprenden motivos de bases triples (por ejemplo, GGG, CCC, AAA, o TTT); (4) secuencias que comprenden series de 7 o más G/C seguidas; y (5) secuencias que comprenden repeticiones directas de 4 o más bases en los candidatos, dando como resultado estructuras plegadas internas. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que aún pueden seleccionarse secuencias con una o más de las características anteriores para su análisis y ensayo adicional como potenciales secuencias de ARNpi.

En algunas realizaciones, las secuencias potenciales de ARNpi pueden analizarse adicionalmente basándose en la asimetría del dúplex de ARNpi, tal como se describe en, por ejemplo, Khvorova et al., *Cell*, 115:209-216 (2003); y Schwarz et al., *Cell*, 115:199-208 (2003). En otras realizaciones, las secuencias potenciales de ARNpi pueden analizarse adicionalmente basándose en la estructura secundaria en el sitio diana, tal como se describe en, por ejemplo, Luo et al., *Biophys. Res. Commun.*, 318:303-310 (2004). Por ejemplo, puede modelarse la estructura secundaria en el sitio diana usando el algoritmo Mfold (disponible en http://mfold.burnet.edu.au/rna_form) para seleccionar secuencias de ARNpi que favorecen la accesibilidad en el sitio diana donde está presente una menor cantidad de estructura secundaria en forma de emparejamiento de bases y de tallo-bucle.

Una vez que se ha identificado una secuencia potencial de ARNpi, puede analizarse la secuencia respecto de la presencia de cualquier propiedad inmunoestimuladora, por ejemplo, usando un ensayo de citocinas *in vitro* o un modelo animal *in vivo*. Los motivos en la hebra codificante y/o no codificante de la secuencia de ARNpi, tales como los motivos ricos en GU (por ejemplo, 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3', etc.) también pueden proporcionar una indicación de si la secuencia puede ser inmunoestimuladora. Una vez que se ha observado que una molécula de ARNpi es inmunoestimuladora, puede modificarse para reducir sus propiedades inmunoestimuladoras, tal como se describe en el presente documento. Como ejemplo no limitante, puede ponerse en contacto una secuencia de ARNpi con una célula de mamífero sensible en condiciones tales que la célula produce una respuesta inmunitaria detectable para determinar si el ARNpi es un ARNpi inmunoestimulador o no inmunoestimulador. La célula de mamífero sensible puede ser de un mamífero no sensibilizado previamente (es decir, un mamífero que no ha estado en contacto anteriormente con el producto génico de la secuencia de ARNpi). La célula de mamífero sensible puede ser, por ejemplo, una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un macrófago, y similares. La respuesta inmunitaria detectable puede comprender la producción de una citocina o un factor de crecimiento, tal como, por ejemplo, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, o una combinación de los mismos. Una vez que se ha identificado que un ARNpi es inmunoestimulador, este puede modificarse posteriormente para reducir sus propiedades inmunoestimuladoras, reemplazando al menos uno de los nucleótidos en la hebra codificante y/o no codificante con nucleótidos modificados. Por ejemplo, menos de aproximadamente el 30% (por ejemplo, menos de aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del dúplex de ARNpi pueden reemplazarse con nucleótidos modificados, tales como nucleótidos de 2'OMe. Entonces puede ponerse en contacto el ARNpi modificado con una célula de mamífero sensible, tal como se ha descrito anteriormente, para confirmar que se han reducido o suprimido sus propiedades inmunoestimuladoras.

Los ensayos *in vitro* adecuados para detectar una respuesta inmune incluyen, pero sin limitación, la técnica de

inmunoensayo en sándwich con doble anticuerpo monoclonal de David et al. (Patente de los Estados Unidos n.º 4.376.110); ensayos en sándwich con anticuerpo monoclonal-policlonal (Wide et al., en Kirkham y Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. y S. Livingstone, Edimburgo (1970)); el método de "transferencia de Western" de Gordon et al. (Patente de los Estados Unidos n.º 4.452.901); inmunoprecipitación de ligando marcado (Brown et al., J. Biol. Chem., 255:4980-4983 (1980)); ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA), tal como se describen, por ejemplo, por Raines et al., J. Biol. Chem., 257:5154-5160 (1982); técnicas inmunocitoquímicas, incluyendo el uso de fluorocromos (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 39:477 (1980)); y neutralización de la actividad (Bowen-Pope et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA), 81:2396-2400 (1984)). Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, hay disponibles una serie de inmunoensayos diferentes, incluyendo aquellos descritos en las Patentes de los Estados Unidos n.º 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Un ejemplo no limitante de un modelo *in vivo* para detectar una respuesta inmunitaria incluye un ensayo de inducción de citocinas en ratón *in vivo* tal como se describe en, por ejemplo, Judge et al., Mol. Ther., 13:494-505 (2006). En determinadas realizaciones, el ensayo puede efectuarse del modo siguiente: (1) puede administrarse ARNpi mediante inyección intravenosa convencional en la vena caudal lateral; (2) puede extraerse sangre mediante punción cardíaca aproximadamente 6 horas después de la administración y procesarse en forma de plasma para el análisis de citocinas; y (3) pueden cuantificarse las citocinas usando kits de ELISA sándwich según las instrucciones del fabricante (por ejemplo, IFN- α de ratón y de ser humano (PBL Biomedical; Piscataway, NJ); IL-6 y TNF- α humanos (eBioscience; San Diego, CA); e IL-6, TNF- α , e IFN- γ de ratón (BD Biosciences; San Diego, CA)).

Están disponibles comercialmente anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a citocinas y factores de crecimiento a través de diversos proveedores y pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Köhler et al., Nature, 256: 495-497 (1975) y Harlow y Lane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publication, Nueva York (1999)). La generación de anticuerpos monoclonales se ha descrito anteriormente y puede lograrse por cualquier medio conocido en la técnica (Buhning et al., en Hybridoma, Vol. 10, N.º 1, págs. 77-78 (1991)). En algunos métodos, se marca el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, con cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos, o químicos) para facilitar su detección.

30

(2) Generación de moléculas de ARNpi

El ARNpi puede proporcionarse en varias formas, incluyendo, por ejemplo, en forma de uno o más dúplex de ARN pequeño de interferencia (ARNpi), en forma de un ARN bicatenario más largo (ARNbc), o en forma de un ARNpi o ARNbc transcrito a partir de un casete transcripcional en un plásmido de ADN. En algunas realizaciones, el ARNpi puede producirse enzimáticamente o mediante síntesis orgánica parcial/total, y puede introducirse ribonucleótidos modificados mediante síntesis *in vitro* enzimática u orgánica. En determinados casos, cada hebra se prepara por medios químicos. Los métodos para sintetizar moléculas de ARN se conocen en la técnica, por ejemplo, los métodos de síntesis química tal como se describen en Verma y Eckstein (1998) o tal como se describe en el presente documento.

40

Puede usarse una población de ARN para proporcionar ARN precursores largos, o pueden usarse ARN precursores largos que tienen identidad sustancial o completa con una secuencia diana seleccionada para producir el ARNpi. Los ARN pueden aislarse a partir de células o tejido, sintetizarse, y/o clonarse de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la materia. El ARN puede ser una población mixta (obtenida a partir de células o tejido, transcrito a partir de ADNc, extraído, seleccionado, etc.), o puede representar una sola secuencia diana. El ARN puede ser de origen natural (por ejemplo, aislado a partir de muestras de tejidos o células), sintetizarse *in vitro* (por ejemplo, usando polimerasa T7 o SP6 y productos PCR o un ADNc clonado), o sintetizarse químicamente.

45

Para formar un ARNbc largo, para ARN sintéticos, también se transcribe el complemento *in vitro* y se hibrida para formar un ARNbc. En caso de usar una población de ARN de origen natural, también se proporcionan los complementos de ARN (por ejemplo, para formar ARNbc para su digestión por RNasa II de *E. coli* o Dicer), por ejemplo, transcribiendo ADNc correspondientes a la población de ARN, o mediante el uso de ARN polimerasas. Posteriormente, se hibridan los ARN precursores para formar ARN bicatenarios para su digestión. Los ARNbc pueden administrarse directamente a un sujeto o pueden digerirse *in vitro* antes de su administración.

50

Los métodos para aislar ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, producir y explorar bibliotecas de ADNc, y llevar a cabo la PCR se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Gubler y Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983); Sambrook *et al.*, anteriormente citado; Ausubel *et al.*, anteriormente citado), así como los métodos para la PCR (véanse, las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.683.202; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Innis et al., eds, 1990)). Las bibliotecas de expresión también son de sobra conocidas para los expertos en la materia. Los textos básicos adicionales que divulgan los métodos de uso generales de la presente invención incluyen Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2ª ed. 1989); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); y Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994).

60

65

Preferentemente, el ARNpi se sintetiza químicamente. Los oligonucleótidos que comprenden las moléculas de

ARNpi de la invención pueden sintetizarse usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la materia, tales como aquellas descritas en Usman et al., J Am. Chem. Soc., 109:7845 (1987); Scaringe et al., Nucl. Acids Res., 18:5433 (1990); Wincott et al., Nucl. Acids Res., 23:2677-2684 (1995); y Wincott et al., Methods Mol. Bio., 74:59 (1997). La síntesis de oligonucleótidos emplea grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Como ejemplo no limitante, pueden efectuarse síntesis a pequeña escala en un sintetizador de Applied Biosystems usando un protocolo a escala de 0,2 μ mol. Como alternativa, pueden efectuarse síntesis a escala de 0,2 μ mol en un sintetizador de placa de 96 pocillos de Protogene (Palo Alto, CA). Sin embargo, también se encuentra dentro del alcance de la invención una síntesis a mayor o menor escala. Los reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, los métodos para la desprotección del ARN, y los métodos para la purificación del ARN son conocidos para los expertos en la materia.

También pueden sintetizarse moléculas de ARNpi mediante una técnica de síntesis en tándem, en la que se sintetizan ambas hebras en forma de un solo fragmento o hebra continua de oligonucleótidos separada mediante un enlazador escindible que se escinde posteriormente para proporcionar fragmentos o hebras separadas que hibridan para formar el dúplex de ARNpi. El enlazador puede ser un enlazador polinucleotídico o un enlazador no nucleotídico. La síntesis en tándem de ARNpi puede adaptarse fácilmente para plataformas de síntesis multipocillo/multiplaca, así como para plataformas de síntesis a gran escala empleando reactores por lotes, columnas de síntesis, y similares. Como alternativa, pueden ensamblarse las moléculas de ARNpi a partir de dos oligonucleótidos distintos, en los que un oligonucleótido comprende la hebra codificante y el otro comprende la hebra no codificante del ARNpi. Por ejemplo, puede sintetizarse cada hebra por separado y unir las hebras entre sí mediante hibridación o ligamiento después de la síntesis y/o desprotección. En otros casos determinados, pueden sintetizarse moléculas de ARNpi en forma de un solo fragmento de oligonucleótido continuo, donde las regiones codificantes y no codificantes autocomplementarias se hibridan para formar un dúplex de ARNpi que tiene estructura secundaria en horquilla.

(3) Modificación de secuencias de ARNpi

En determinados aspectos, las moléculas de ARNpi comprenden un dúplex que tiene dos hebras y al menos un nucleótido modificado en la región bicatenaria, en las que cada hebra tiene de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. Ventajosamente, el ARNpi modificado es menos inmunoestimulador que una secuencia de ARNpi no modificada correspondiente, pero mantiene la capacidad de silenciar la expresión de una secuencia diana. En realizaciones preferidas, el grado de las modificaciones químicas introducidas en el ARNpi impone un equilibrio entre la reducción o la supresión de las propiedades inmunoestimuladoras del ARNpi y la retención de la actividad de iARN. Como ejemplo no limitante, puede modificarse mínimamente una molécula de ARNpi que se dirige a un gen de interés (por ejemplo, modificada en menos de aproximadamente un 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5%) en nucleótidos seleccionados de uridina y/o guanosina dentro del dúplex de ARNpi para eliminar la respuesta inmunitaria generada por el ARNpi a la vez que se retiene su capacidad para silenciar la expresión del gen diana.

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

En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNpi pueden comprender además una o más modificaciones químicas, tales como restos de tapón terminales, modificaciones en la cadena principal de fosfato, y similares. Los ejemplos de restos de tapón terminales incluyen, sin limitación, restos desoxi abásicos invertidos, modificaciones de glicerilo, nucleótidos de 4',5'-metileno, nucleótidos de 1-(β -D-eritrofuranosilo), nucleótidos de 4'-tio, nucleótidos carbocíclicos, nucleótidos de 1,5-anhidrohexitol, L-nucleótidos, α -nucleótidos, nucleótidos con bases modificadas, nucleótidos de *treo*-pentafuranosilo, nucleótidos acíclicos de 3',4'-seco, nucleótidos acíclicos de 3,4-dihidroxibutilo, nucleótidos acíclicos de 3,5-dihidroxipentilo, restos de nucleótidos 3'-3'-invertidos, restos abásicos 3'-3'-invertidos, restos de nucleótidos 3'-2'-invertidos, restos abásicos 3'-2'-invertidos, restos de nucleótidos 5'-5'-invertidos, restos abásicos 5'-5'-invertidos, restos abásicos desoxi 3'-5'-invertidos, fosfato de 5'-amino-alquilo, fosfato de 1,3-diamino-

2-propilo, fosfato de 3-aminopropilo, fosfato de 6-aminohexilo, fosfato de 1,2-aminodecilo, fosfato de hidroxipropilo, fosfato de 1,4-butanodiol, 3'-fosforamidato, 5'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexil fosfato, 3'-fosfato, 5'-amino, 3'-fosforotioato, 5'-fosforotioato, fosforoditioato, y restos de metil-fosfonato o 5'-mercapto puenteantes o no puenteantes (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.998.203; Beaucage et al., *Tetrahedron* 49:1925 (1993)).

5 Los ejemplos no limitantes de modificación en la cadena principal de fosfato (es decir, que dan como resultado enlaces internucleótido modificados) incluyen sustituciones fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato, carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal, y alquilsililo (véase, por ejemplo, Hunziker et al., *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, en *Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker et al., *Novel Backbone Replacements for*

10 *Oligonucleotides*, en *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39 (1994)). Dichas modificaciones químicas pueden producirse en el extremo 5' y/o en el extremo 3' de la hebra codificante, de la hebra no codificante, o en ambas hebras del ARNpi.

En algunas realizaciones, la hebra codificante y/o no codificante de la molécula de ARNpi puede comprender además un saliente 3'-terminal que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 (por ejemplo, 1, 2, 3, o 4) 2'-desoxi nucleótidos, ribonucleótidos de uridina modificados (por ejemplo, 2'OMe) y/o no modificados, y/o cualquier otra combinación de nucleótidos modificados (por ejemplo, 2'OMe) y no modificados.

15

Los ejemplos adicionales de nucleótidos modificados y de tipos de modificaciones químicas que pueden introducirse en las moléculas de ARNpi se describen, por ejemplo, en la Patente del Reino Unido GB 2.397.818 B y en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20040192626, 20050282188, y 20070135372.

20

Las moléculas de ARNpi descritas en el presente documento pueden comprender opcionalmente uno o más nucleótidos en una o ambas hebras del ARNpi. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "no nucleótido" se refiere a cualquier grupo o compuesto que pueda incorporarse en una cadena de ácido nucleico en lugar de una o más unidades de nucleótido, incluyendo sustituciones de azúcar y/o fosfato, y permiten a las demás bases mostrar su actividad. El grupo o compuesto es abásico en tanto que no contiene una base de nucleótido comúnmente reconocida, tal como adenosina, guanina, citosina, uracilo, o timina y por lo tanto, carece de una base en la posición 1'.

25

30

En otras realizaciones, la modificación química del ARNpi comprende unir un conjugado a la molécula de ARNpi. El conjugado puede unirse en el extremo 5' y/o 3' de la hebra codificante y/o no codificante del ARNpi a través de una unión covalente, tal como, por ejemplo, un enlazador biodegradable. El conjugado también puede unirse al ARNpi, por ejemplo, a través de un grupo carbamato u otro grupo enlazador (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20050074771, 20050043219, y 20050158727). En determinados casos, el conjugado es una molécula que facilita el suministro del ARNpi dentro de una célula. Los ejemplos de moléculas conjugadas adecuados para su unión a ARNpi incluyen, sin limitación, esteroides, tales como colesterol, glicoles, tales como polietilenglicol (PEG), albúmina sérica humana (HSA), ácidos grasos, carotenoides, terpenos, ácidos biliares, folatos (por ejemplo, ácido fólico, análogos de folato y derivados de los mismos), azúcares (por ejemplo, galactosa, galactosamina, N-acetil galactosamina, glucosa, manosa, fructosa, fucosa, etc.), fosfolípidos, péptidos, ligandos para receptores celulares capaces de mediar la captación celular, y combinaciones de los mismos (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20030130186, 20040110296, y 20040249178; la Patente de los Estados Unidos n.º 6.753.423). Otros ejemplos incluyen un resto lipófilo, vitamina, polímero, péptido, proteína, ácido nucleico, molécula pequeña, oligosacárido, agrupación de carbohidratos, intercalante, molécula de unión al surco menor, agente de escisión, y moléculas conjugadas a agente reticulante descritas en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20050119470 y 20050107325. Otros ejemplos más incluyen las moléculas conjugadas a 2'-O-alkil amina, 2'-O-alcóxialquil amina, poliamina, pirimidina catiónica modificada con C5, péptido catiónico, grupo guanidinio, grupo amidinino, de aminoácidos catiónicos descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20050153337. Los ejemplos adicionales incluyen las moléculas conjugadas a grupo hidrófobo, compuesto activo de membrana, compuesto penetrante de membrana, señal de direccionamiento celular, modificador de la interacción, y a estabilizador estérico descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20040167090. Los ejemplos adicionales incluyen las moléculas conjugadas descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20050239739. Puede evaluarse el tipo de conjugado usado y el alcance de la conjugación a la molécula de ARNpi respecto de perfiles farmacocinéticos, biodisponibilidad, y/o estabilidad mejoradas del ARNpi a la vez que se retiene la actividad de iARN. Como tal, un experto en la materia puede explorar moléculas de ARNpi que tienen diversos conjugados unidos a las mismas para identificar aquellas que tienen propiedades mejoradas y una actividad de iARN completa usando cualquiera de una serie de modelos de cultivo celular *in vitro* o animales *in vivo*. Genes diana

35

40

45

50

55

El componente de ARNpi de las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención (por ejemplo, SNALP) puede usarse para regular negativamente o silenciar la traducción (es decir, la expresión) de un gen de interés. Tal como se ha mencionado anteriormente, se ha descubierto sorprendentemente que las partículas de ácido nucleico-lípido de la presente invención (es decir, formulaciones de SNALP) que contienen al menos un ARNpi tal como se ha divulgado en el presente documento muestran una potencia aumentada (es decir, silenciamiento aumentado) y/o una tolerabilidad aumentada (por ejemplo, toxicidad reducida) cuando se dirigen a un gen de interés en una célula tumoral, cuando se comparan con otras composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido descritas

60

65

anteriormente. En realizaciones preferidas, el ARNpi silencia la expresión de un gen asociado con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular (por ejemplo, un trastorno de la proliferación celular, tal como el cáncer). Otros genes de interés incluyen, pero sin limitación, genes angiogénicos, genes de ligando de receptor, genes inmunomoduladores (por ejemplo, aquellos asociados con respuestas inflamatorias y autoinmunitarias), genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedades y trastornos hepáticos), genes asociados con la infección y supervivencia vírica, y genes asociados con trastornos neurodegenerativos.

Los genes asociados con la tumorigénesis o la transformación celular (por ejemplo, cáncer u otra neoplasia) incluyen, por ejemplo, genes implicados en la ubiquitinación de p53, la ubiquitinación de c-Jun, la desacetilación de histonas, la regulación del ciclo celular, la regulación transcripcional, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos no limitantes de secuencias génicas asociadas con la tumorigénesis o la transformación celular incluyen serina/treonina cinasas, tales como la cinasa 1 similar a polo (PLK-1) (n.º de referencia de GenBank NM_005030; Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)) y la cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) (n.º de referencia de GenBank NM_000075); ubiquitina ligasas, tales como COP1 (RFWD2; n.º de referencia de GenBank NM_022457 y NM_001001740) y ring-box 1 (RBX1) (ROC1; n.º de referencia de GenBank NM_014248); tirosina cinasas, tales como WEE1 (n.º de referencia de GenBank NM_003390 y NM_001143976); cinesinas mitóticas, tales como Eg5 (KSP, KIF11; n.º de referencia de GenBank NM_004523); factores de transcripción, tales como caja de forkhead M1 (FOXM1) (n.º de referencia de GenBank NM_202002, M_021953, y NM_202003) y RAM2 (R1 o CDCA7L; n.º de referencia de GenBank M_018719, NM_001127370, y NM_001127371); inhibidores de la apoptosis, tales como XIAP (n.º de referencia de GenBank M_001167); subunidades del señalosoma COP9, tales como CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 (JAB1; n.º de referencia de GenBank NM_006837); CSN6, CSN7A, CSN7B, y CSN8; e histona desacetilasas, tales como HDAC1, HDAC2 (n.º de referencia de GenBank NM_001527), HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, etc.

Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen de PLK-1 incluyen aquellos descritos en el presente documento y en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20050107316 y 20070265438; y la Publicación PCT n.º WO 09/082817. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a los genes Eg5 y XIAP incluyen aquellas descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20090149403. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen CSN5 incluyen aquellas descritas en la Publicación PCT n.º WO 09/129319. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a los genes COP1, CSN5, RBX1, HDAC2, CDK4, WEE1, FOXM1, y RAM2 incluyen aquellas descritas en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/245.143, presentada el 23 de septiembre de 2009.

Los ejemplos adicionales de secuencias génicas asociadas con la tumorigénesis o la transformación celular incluyen secuencias de translocación, tales como los genes de fusión de MLL, BCR-ABL (Wilda et al., Oncogene, 21:5716 (2002); Scherr et al., Blood, 101:1566 (2003)), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO, y AML1-MTG8 (Heidenreich et al., Blood, 101:3157 (2003)); secuencias sobreexpresadas, tales como los genes de 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 (Kosciólek et al., Mol Cancer Ther., 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, receptores de factores de crecimiento (por ejemplo, EGFR/ErbB1 (n.º de referencia de GenBank NM_005228, NM_201282, NM_201283, y NM_201284; véanse también, Nagy et al. Exp. Cell Res., 285:39-49 (2003)), ErbB2/HER-2 (n.º de referencia de GenBank NM_004448 y NM_001005862), ErbB3 (n.º de referencia de GenBank NM_001982 y NM_001005915), y ErbB4 (n.º de referencia de GenBank NM_005235 y NM_001042599)), y secuencias mutadas, tales como RAS (Tuschl y Borkhardt, Mol. Interventions, 2:158 (2002)). Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen EGFR incluyen aquellas descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20090149403. Las moléculas de ARNpi que se dirigen a los genes de VEGFR se exponen en, por ejemplo, el documento GB 2396864; la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20040142895; y el documento CA 2456444.

El silenciamiento de secuencias que codifican enzimas de reparación del ADN es útil 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 tumoral también son secuencias diana de interés, por ejemplo, integrinas, selectinas, y metaloproteínasa. Los ejemplos anteriores no son excluyentes. Los expertos en la materia entenderán que puede incluirse cualquier secuencia génica completa o parcial que facilite o promueva la tumorigénesis o la transformación celular, el crecimiento tumoral, o la migración tumoral como secuencia molde.

Los genes angiogénicos son capaces de promover la formación de nuevos vasos. Los genes angiogénicos de particular interés incluyen, pero sin limitación, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Reich et al., Mol. Vis., 9:210 (2003)), en factor de crecimiento placentario (PGF), VEGFR-1 (Fit-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), y similares. Las moléculas de ARNpi que se dirigen a genes de VEGFR se exponen en, por ejemplo, el documento GB 2396864; la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20040142895; y el documento CA 2456444.

Los genes inmunomoduladores son genes que modulan una o más respuestas inmunitarias. Los ejemplos de genes inmunomoduladores incluyen, sin limitación, factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- α , TGF- $\eta\beta$, EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, 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 de ligando de Fas también son secuencias diana inmunomoduladoras de interés (Song et al., *Nat. Med.*, 9:347 (2003)). Los genes que codifican moléculas de señalización secundarias en células hematopoyéticas y linfoides también se incluyen en la presente invención, por ejemplo, las cinasas de la familia Tec y la tirosina cinasa de Bruton (Btk) (Heinonen et al., *FEBS Lett.*, 527:274 (2002)).

Los genes de ligando de receptor celular incluyen ligandos que son capaces de unirse a receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptores de citocinas, receptores de factores de crecimiento, receptores con actividad de tirosina cinasa, receptores acoplados a proteína G, receptor de insulina, receptor de EPO, *etc.*) para modular (por ejemplo, inhibir) la ruta fisiológica en la que esté implicado el receptor (por ejemplo, la proliferación celular, la tumorigénesis, la transformación celular, la mitogénesis, *etc.*). Los ejemplos no limitantes de genes de ligando de receptor celular incluyen citocinas (por ejemplo, TNF- α , interferones, tales como IFN- α , IFN- β , e IFN- γ , interleucinas, tales como IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, quimiocinas, *etc.*), factores de crecimiento (por ejemplo, EGF, HB-EGF, VEGF, PEDF, SDGF, bFGF, HGF, TGF- α , TGF- β , BMP 1-BMP 15, PDGF, IGF, NGF, β -NGF, BDNF, NT3, NT4, GDF-9, CGF, G-CSF, GM-CSF, GDF-8, EPO, TPO, *etc.*), insulina, glucagón, ligandos de receptor acoplado a proteína G, *etc.*

Los genes asociados con la infección y supervivencia vírica incluyen aquellos expresados por un hospedador (por ejemplo, un factor del hospedador, tal como factor tisular (TF)) o un virus para que se una, entre, y se replique en una célula. Son particularmente interesantes las secuencias víricas asociadas con enfermedades víricas crónicas. Las secuencias víricas de particular interés incluyen secuencias de filovirus, tales como el virus del Ébola y el virus de Marburgo (véase, por ejemplo, Geisbert et al., *J. Infect. Dis.*, 193:1650-1657 (2006)); arenavirus, tales como el virus de Lassa, el virus Junin, el virus de Machupo, el virus de Guanarito, y el virus de Sabia (Buchmeier *et al.*, *Arenaviridae: the viruses and their replication*, En: *FIELDS VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4^a ed., Lippincott-Raven, Filadelfia, (2001)); virus de la gripe, tales como los virus de la gripe A, B, y C, (véase, por ejemplo, Steinhauer et al., *Annu Rev Genet.*, 36:305-332 (2002); y Neumann et al., *J Gen Virol.*, 83:2635-2662 (2002)); virus de la hepatitis (véase, por ejemplo, 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. USA*, 100:2783 (2003); Kapadia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2014 (2003); y *FIELDS VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4^a ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (2001)); el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Banerjee 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. USA*, 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)).

Las secuencias de ácido nucleico de filovirus ejemplares que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, VP30, VP35, nucleoproteína (NP), proteína polimerasa (L-pol)) y proteínas asociadas a membrana (por ejemplo, VP40, glucoproteína (GP), VP24). Las secuencias genómicas completas para el virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank NC_002549; AY769362; NC_006432; NC_004161; AY729654; AY354458; AY142960; AB050936; AF522874; AF499101; AF272001; y AF086833. Las secuencias de VP24 del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank U77385 y AY058897. Las secuencias de L-pol del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, el n.^o de referencia de GenBank X67110. Las secuencias de VP40 del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, el n.^o de referencia de GenBank AY058896. Las secuencias de NP del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, el n.^o de referencia de GenBank AY058895. Las secuencias de GP del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, el n.^o de referencia de GenBank AY058898; Sanchez et al., *Virus Res.*, 29:215-240 (1993); Will et al., *J. Virol.*, 67:1203-1210 (1993); Volchkov et al., *FEBS Lett.*, 305:181-184 (1992); y la Patente de los Estados Unidos n.^o 6.713.069. Se exponen secuencias adicionales del virus del Ébola en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank L11365 y X61274. Las secuencias genómicas completas para el virus de Marburgo se exponen en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank NC_001608; AY430365; AY430366; y AY358025. Las secuencias de GP del virus de Marburgo se exponen en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank AF005734; AF005733; y AF005732. Las secuencias de VP35 del virus de Marburgo se exponen en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank AF005731 y AF005730. Se exponen secuencias adicionales del virus de Marburgo en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank X64406; Z29337; AF005735; y Z12132. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a secuencias de ácido nucleico del virus del Ébola y del virus de Marburgo incluyen aquellas descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.^o 20070135370 y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.^o 61/286.741, presentada el 15 de diciembre de 2009.

Las secuencias de ácido nucleico de arenavirus ejemplares que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican nucleoproteína (NP), glucoproteína (GP), L-polimerasa (L), y proteína Z (Z). Las secuencias genómicas completas para el virus de Lassa se exponen en, por ejemplo, los n.^{os} de referencia de GenBank NC_004296 (segmento S de LASV) y NC_004297 (segmento L de LASV). Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a secuencias de ácido nucleico del virus de Lassa incluyen aquellas descritas en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.^o 61/319.855, presentada el 31 de marzo de 2010.

Las secuencias de ácido nucleico de hospedador ejemplares que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican factores de hospedador, tales como factor tisular (TF) que se sabe que

desempeñan un papel en la patogénesis de los virus de las fiebres hemorrágicas. La secuencia de ARNm de TF se expone en el n.º de referencia de GenBank NM_001993. Los expertos en la materia apreciarán que TF también se conoce como F3, factor III de coagulación, tromboplastina, y CD142. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a secuencias de ácido nucleico de TF incluyen aquellas descritas en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/319.855, presentada el 31 de marzo de 2010.

Las secuencias de ácido nucleico del virus de la gripe ejemplares que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico que codifican nucleoproteína (NP), proteínas de matriz (M1 y M2), proteínas no estructurales (NS1 y NS2), ARN polimerasa (PA, PB1, PB2), neuraminidasa (NA), y hemaglutinina (HA). Las secuencias de NP de la gripe A se exponen en, por ejemplo, los n.ºs de referencia de GenBank NC_004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046; AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; y AY818140. Las secuencias de PA de la gripe A se exponen en, por ejemplo, los n.ºs de referencia de GenBank AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; y AY724786. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a secuencias de ácido nucleico del virus de la gripe incluyen aquellas descritas en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20070218122.

Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis ejemplares que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, secuencias de ácido nucleico implicadas en la transcripción y la traducción (por ejemplo, En1, En2, X, P) y secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, proteínas de núcleo incluyendo proteínas C y relacionadas con C, proteínas de la cápside y la envuelta, incluyendo las proteínas S, M, y/o L, o fragmentos de las mismas) (véase, por ejemplo, FIELDS VIROLOGY, *anteriormente citado*). Las secuencias de ácido nucleico ejemplares del virus de la hepatitis C (VHC) que pueden silenciarse incluyen, pero sin limitación, la región 5' no traducida (5'-UTR), la región 3' no traducida (3'-UTR), la región de codón de inicio de la traducción de poliproteína, la secuencia de sitio de entrada a ribosoma interno (IRES), y/o secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína de núcleo, la proteína E1, la proteína E2, la proteína p7, la proteína NS2, la proteasa/helicasa NS3, la proteína NS4A, la proteína NS4B, la proteína NS5A, y/o la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B. Las secuencias genómicas del VHC se exponen en, por ejemplo, los n.ºs de referencia de GenBank NC_004102 (genotipo 1a del VHC), AJ238799 (genotipo 1b del VHC), NC_009823 (genotipo 2 del VHC), NC_009824 (genotipo 3 del VHC), NC_009825 (genotipo 4 del VHC), NC_009826 (genotipo 5 del VHC), y NC_009827 (genotipo 6 del VHC). Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis A se exponen en, por ejemplo, el n.º de referencia de GenBank NC_001489; Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis B se exponen en, por ejemplo, el n.º de referencia de GenBank NC_003977; Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis D se exponen en, por ejemplo, el n.º de referencia de GenBank NC_001653; Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis E se exponen en, por ejemplo, el n.º de referencia de GenBank NC_001434; Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis G se exponen en, por ejemplo, el n.º de referencia de GenBank NC_001710. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con la infección y la supervivencia vírica puede usarse de manera conveniente en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar la infección vírica. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen a secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis incluyen aquellas descritas en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20060281175, 20050058982, y 20070149470; la Patente de los Estados Unidos n.º 7.348.314; y la Solicitud PCT n.º PCT/CA2010/000444, titulada "Compositions and Methods for Silencing Hepatitis C Virus Expression", presentada el 19 de marzo de 2010, que tiene el n.º de expediente del agente 020801-008910PC.

Los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, trastornos en los que el hígado es la diana y las enfermedades y trastornos hepáticos) incluyen, pero sin limitación, genes expresados en la dislipidemia, tales como, por ejemplo, apolipoproteína B (APOB) (n.º de referencia de GenBank NM_000384), apolipoproteína CIII (APOC3) (n.ºs de referencia de GenBank NM_000040 y NG_008949 REGIÓN: 5001..8164), apolipoproteína E (APOE) (n.ºs de referencia de GenBank NM_000041 y NG_007084 REGIÓN: 5001..8612), subtilisina/quexina convertasa de proproteína de tipo 9 (PCSK9) (n.º de referencia de GenBank M_174936), diacilglicerol O-aciltransferasa de tipo 1 (DGAT1) (n.º de referencia de GenBank NM_012079), diacilglicerol O-aciltransferasa de tipo 2 (DGAT2) (n.º de referencia de GenBank NM_032564), receptores X hepáticos, tales como LXRA y LXRβ (n.º de referencia de GenBank NM_007121), receptores X farnesoides (FXR) (n.º de referencia de GenBank NM_005123), proteína de unión a elemento regulador de colesterol (SREBP), proteasa de sitio 1 (SIP), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (HMG coenzima A reductasa); y genes expresados en la diabetes, tales como, por ejemplo, glucosa 6-fosfatasa (véase, por ejemplo, Forman et al., Cell, 81:687 (1995); Seol et al., Mol. Endocrinol., 9:72 (1995); Zavacki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 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., 9:1033-1045 (1995); Lehmann et al., J. Biol. Chem., 272:3137-3140 (1997); Janowski et al., Nature, 383:728-731 (1996); y Peet et al., Cell, 93:693-704 (1998)).

Un experto en la materia apreciará que los genes asociados con las enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedades y trastornos en los que el hígado es una diana y enfermedades y trastornos hepáticos)

- incluyen genes que se expresan en el hígado en sí así como genes expresados en otros órganos y tejidos. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con las enfermedades y trastornos metabólicos pueden usarse de manera conveniente en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar la enfermedad o el trastorno. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen APOB
- 5 incluyen aquellas descritas en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20060134189, 20060105976, y 20070135372, y la Publicación PCT n.º WO 04/091515. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen APOC3 incluyen aquellas descritas en la Solicitud PCT n.º PCT/CA2010/000120, presentada el 26 de enero de 2010. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNpi que se dirigen al gen PCSK9 incluyen aquellas descritas en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20070173473, 20080113930, y 20080306015.
- 10 Las moléculas de ARNpi ejemplares que se dirigen al gen DGAT1 pueden diseñarse usando los compuestos no codificantes descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20040185559. Las moléculas de ARNpi ejemplares que se dirigen al gen DGAT2 pueden diseñarse usando los compuestos no codificantes descritos en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20050043524.
- 15 Los moldes que codifican una expansión de repeticiones de trinucleótido (por ejemplo, repeticiones de CAG) son útiles para silenciar secuencias patógenas en trastornos neurodegenerativos causados por la expansión de repeticiones de trinucleótido, tales como la atrofia muscular espinobulbar y la enfermedad de Huntington (Caplen et al., Hum. Mol. Genet., 11:175 (2002)).
- 20 Además de su utilidad para silenciar la expresión de cualquiera de los genes anteriormente descritos con fines terapéuticos, los ARNpi descritos en el presente documento también son útiles en aplicaciones de investigación y desarrollo así como en aplicaciones diagnósticas, profilácticas, pronósticas, clínicas, y otras del cuidado de la salud. Como ejemplo no limitante, el ARNpi puede usarse en estudios de validación de la diana dirigidos a ensayar si un gen de interés tiene el potencial de ser una diana terapéutica. El ARNpi también puede usarse en estudios de
- 25 identificación de dianas dirigidos a descubrir genes como dianas terapéuticas potenciales.

(4) Realizaciones del ARNpi ejemplares

30 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, cada hebra de la molécula de ARNpi comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, o 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de longitud). En una realización particular, el ARNpi se sintetiza químicamente. Las moléculas de ARNpi descritas en el presente documento son capaces de silenciar la expresión de una secuencia diana *in vitro* y/o *in vivo*.

35 En otras realizaciones descritas en el presente documento, el ARNpi comprende al menos un nucleótido modificado. En determinadas realizaciones, el ARNpi comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más nucleótidos modificados en la región bicatenaria. En realizaciones particulares, menos de aproximadamente el 50% (por ejemplo, menos de aproximadamente un 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o 5%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos modificados. En realizaciones preferidas, de

40 aproximadamente un 1% a aproximadamente un 50% (por ejemplo, aproximadamente un 5%-50%, 10%-50%, 15%-50%, 20%-50%, 25%-50%, 30%-50%, 35%-50%, 40%-50%, 45%-50%, 5%-45%, 10%-45%, 15%-45%, 20%-45%, 25%-45%, 30%-45%, 35%-45%, 40%-45%, 5%-40%, 10%-40%, 15%-40%, 20%-40%, 25%-40%, 30%-40%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 25%-35%, 30%-35%, 5%-30%, 10%-30%, 15%-30%, 20%-30%, 25%-30%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-25%, 5%-20%, 10%-20%, 15%-20%, 5%-15%, 10%-15%, o 5%-10%) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNpi comprenden nucleótidos modificados.

En realizaciones adicionales descritas en el presente documento, el ARNpi comprende nucleótidos modificados que incluyen, pero sin limitación, nucleótidos de 2'-O-metilo (2'OMe), nucleótidos de 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), nucleótidos de 2'-desoxi, nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (ALN), y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el ARNpi comprende nucleótidos de 2'OMe (por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe purina y/o pirimidina) tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, nucleótidos de 2'OMe-citosina, o mezclas de los mismos. En una

50 realización particular, el ARNpi comprende al menos un nucleótido de 2'OMe-guanosina, nucleótido de 2'OMe-uridina, o mezclas de los mismos. En determinados casos, el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina.

55 En otras realizaciones, el ARNpi comprende una estructura de bucle de horquilla.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el ARNpi comprende nucleótidos modificados en una hebra (es decir, codificante o no codificante) o en ambas hebras de la región bicatenaria de la molécula de ARNpi. Preferentemente, los nucleótidos de uridina y/o guanosina se modifican en posiciones selectivas en la región

60 bicatenaria del dúplex de ARNpi. Con respecto a las modificaciones de nucleótidos de uridina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más de los nucleótidos de uridina en la hebra codificante y/o no codificante pueden ser un nucleótido de uridina modificado, tal como un nucleótido de 2'OMe-uridina. En algunas realizaciones, cada nucleótido de uridina en la hebra codificante y/o no codificante es un nucleótido de 2'OMe-uridina. Con respecto a las modificaciones de nucleótidos de guanosina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más de los

65 nucleótidos de guanosina en la hebra codificante y/o no codificante pueden ser un nucleótido de guanosina modificado, tal como un nucleótido de 2'OMe-guanosina. En algunas realizaciones, cada nucleótido de guanosina en

la hebra codificante y/o no codificante es un nucleótido de 2'OMe-guanosina.

En determinadas realizaciones descritas en el presente documento, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más motivos 5'-GU-3' en una secuencia de ARNpi pueden estar modificados, por ejemplo, mediante la introducción de desemparejamientos para eliminar los motivos 5'-GU-3' y/o mediante la introducción de nucleótidos modificados, tales como nucleótidos de 2'OMe. El motivo 5'-GU-3' puede encontrarse en la hebra codificante, la hebra no codificante, o en ambas hebras de la secuencia de ARNpi. Los motivos 5'-GU-3' pueden encontrarse adyacentes entre sí o, como alternativa, pueden estar separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más nucleótidos.

En algunas realizaciones, una molécula de ARNpi modificado es menos inmunoestimuladora que una secuencia de ARNpi no modificada correspondiente. En dichas realizaciones, la molécula de ARNpi modificada con propiedades inmunoestimuladoras reducidas retiene ventajosamente la actividad de iARN contra la secuencia diana. En otra realización, pueden equilibrarse u optimizarse las propiedades inmunoestimuladoras de la molécula de ARNpi para silenciar la expresión del gen diana mediante la introducción de modificaciones 2'OMe mínimas y selectivas dentro de la secuencia de ARNpi, tales como, por ejemplo, dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNpi. En determinados casos, el ARNpi modificado es al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% menos estimulante que el ARNpi no modificado correspondiente. Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que las propiedades inmunoestimuladoras de la molécula de ARNpi modificada y la molécula de ARNpi no modificada correspondiente pueden determinarse, por ejemplo, midiendo los niveles de INF- α y/o IL-6 de aproximadamente dos a aproximadamente doce horas después de la administración sistémica en un mamífero o de la transfección de una célula sensible de mamífero usando un sistema de suministro basado en lípidos adecuado (tal como el sistema de suministro de SNALP divulgado en el presente documento).

En otras realizaciones, una molécula de ARNpi tiene una CI_{50} (es decir, concentración inhibidora semimáxima) menor que o igual a diez veces la del ARNpi no modificado correspondiente (es decir, el ARNpi modificado tiene una CI_{50} que es menor de o igual a diez veces la CI_{50} del ARNpi no modificado correspondiente). En otras realizaciones, el ARNpi modificado tiene una CI_{50} menor que o igual a tres veces la de la secuencia de ARNpi no modificada correspondiente. En otras realizaciones más, el ARNpi modificado tiene una CI_{50} menor que o igual a dos veces la del ARNpi no modificado correspondiente. Será evidente para los expertos en la materia que puede generarse una curva de respuesta a la dosis y que pueden determinarse fácilmente los valores de CI_{50} para el ARNpi modificado y el ARNpi no modificado correspondiente usando métodos conocidos para los expertos en la materia.

En otra realización, una molécula de ARNpi no modificada o modificada es capaz de silenciar al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de la expresión de la secuencia diana en relación a un control negativo (por ejemplo, solo también, una secuencia de ARNpi que se dirige a un gen diferente, una secuencia de ARNpi reorganizada, etc.).

En otra realización más, una molécula de ARNpi modificada es capaz de silenciar al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% de la expresión de la secuencia diana en relación a la secuencia de ARNpi no modificada correspondiente.

En algunas realizaciones, la molécula de ARNpi no comprende modificaciones en la cadena principal de fosfato, por ejemplo, en la hebra codificante y/o no codificante de la región bicatenaria. En otras realizaciones, el ARNpi comprende una, dos, tres, cuatro, o más modificaciones en la cadena principal de fosfato, por ejemplo, en la hebra codificante y/o no codificante de la región bicatenaria. En realizaciones preferidas, el ARNpi no comprende modificaciones en la cadena principal de fosfato.

En realizaciones adicionales, el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'-desoxi, por ejemplo, en la hebra codificante y/o no codificante de la región bicatenaria. En otras realizaciones más, el ARNpi comprende uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos de 2'-desoxi, por ejemplo, en la hebra codificante y/o no codificante de la región bicatenaria. En realizaciones preferidas, el ARNpi no comprende nucleótidos de 2'-desoxi.

En determinados casos, el nucleótido en el extremo 3' de la región bicatenaria en la hebra codificante y/o no codificante no es un nucleótido modificado. En otros casos determinados, los nucleótidos próximos al extremo 3' (por ejemplo, con uno, dos, tres, o cuatro nucleótidos en el extremo 3') de la región bicatenaria en la hebra codificante y/o no codificante no son nucleótidos modificados.

Las moléculas de ARNpi descritas en el presente documento pueden tener salientes 3' de uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos en ambos lados de la región bicatenaria, o pueden carecer de salientes (es decir, tener extremos romos) en uno o ambos lados de la región bicatenaria. En determinadas realizaciones, el saliente 3' en la hebra codificante y/o no codificante comprende uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos de 2'OMe y/o cualquier otro nucleótido modificado descrito en el presente documento o conocido en la

técnica.

En realizaciones particulares descritas en el presente documento, los ARNpi se administran usando un sistema transportador, tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida descrita en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNpi que se dirigen a uno o más genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular (por ejemplo, PLK-1); (b) uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o sales de los mismos, tal como se expone en el presente documento); (c) uno o más lípidos no catiónicos (por ejemplo, DPPC, DSPC, DSPE, y/o colesterol); y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA).

b) ARNbc sustrato de Dicer

Tal como se usan en el presente documento, la expresión "ARNbc sustrato de Dicer" o "molécula de iARN precursora" pretende incluir cualquier molécula precursora que se procese *in vivo* por Dicer para producir un ARNpi activo que se incorpore en el complejo RISC para la interferencia de ARN de un gen diana, tal como PLK-1.

En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene una longitud suficiente tal que se procesa por Dicer para producir un ARNbc. De acuerdo con esta realización, el ARBnc sustrato de Dicer comprende (i) una primera secuencia de oligonucleótido (también denominada la hebra codificante) que tiene entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, o 25-30 nucleótidos de longitud), preferentemente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud), y (ii) una segunda secuencia de oligonucleótido (también denominada la hebra no codificante) que se hibrida con la primera secuencia en condiciones biológicas, tales como las condiciones halladas en el citoplasma de una célula. La segunda secuencia de oligonucleótido puede tener entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35, o 25-30 nucleótidos de longitud), y tiene preferentemente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud). Además, una región de una de las secuencias, particularmente de la hebra no codificante, del ARNbc sustrato de Dicer tiene una longitud de secuencia de al menos aproximadamente 19 nucleótidos, por ejemplo, de aproximadamente 19 a aproximadamente 60 nucleótidos (por ejemplo, aproximadamente 19-60, 19-55, 19-50, 19-45, 19-40, 19-35, 19-30, o 19-25 nucleótidos), preferentemente, de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos (por ejemplo, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos) que son lo suficientemente complementarios con una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana como para desencadenar una respuesta de iARN.

En una segunda realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene varias propiedades que potencian su procesamiento por Dicer. De acuerdo con esta realización, el ARNbc tiene una longitud suficiente tal que se procesa por Dicer para producir un ARNpi y tiene al menos una de las siguientes propiedades: (i) el ARNbc es asimétrico, por ejemplo, tiene un saliente 3' en la hebra no codificante; y/o (ii) el ARNbc tiene un extremo 3' modificado en la hebra codificante para dirigir la orientación de la unión y el procesamiento por Dicer del ARNbc en un ARNpi activo. De acuerdo con esta última realización, la hebra codificante comprende de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos y la hebra no codificante comprende de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos.

En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene un saliente en el extremo 3' de la hebra no codificante. En otra realización, la hebra codificante se modifica para la unión y procesamiento por Dicer mediante modificadores adecuados ubicados en el extremo 3' de la hebra codificante. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos, tales como desoxirribonucleótidos, acrilonucleótidos, y similares, y moléculas impedidas estéricamente, tales como moléculas fluorescentes y similares. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, estos reemplazan a los nucleótidos en el ARNbc, de tal forma que no cambia la longitud del ARNbc. En otra realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene un saliente en el extremo 3' de la hebra no codificante y la hebra codificante se modifica para su procesamiento por Dicer. En otra realización, el extremo 5' de la hebra codificante tiene un fosfato. En otra realización, el extremo 5' de la hebra no codificante tiene un fosfato. En otra realización, la hebra no codificante o la hebra codificante o ambas hebras tienen uno o más nucleótidos modificados de 2'-O-metilo (2'OMe). En otra realización, la hebra no codificante contiene nucleótidos modificados con 2'OMe. En otra realización, la hebra no codificante contiene un saliente 3' que está formado por nucleótidos modificados con 2'OMe. La hebra codificante también podría incluir nucleótidos modificados con 2'OMe adicionales. Las hebras codificante y no codificante hibridan en condiciones biológicas, tales como las condiciones halladas en el citoplasma de una célula. Además, una región de una de las secuencias, particularmente de la hebra no codificante, del ARNbc sustrato de Dicer tiene una longitud de secuencia de al menos aproximadamente 19 nucleótidos, en la que estos nucleótidos se encuentran en la región de 21 nucleótidos adyacente al extremo 3' de la hebra no codificante y son lo suficientemente complementarios con una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana, tal como PLK-1. Además, de acuerdo con esta realización, el ARNbc sustrato de Dicer también puede tener una o más de las siguientes propiedades adicionales: (a) la hebra no codificante tiene un desplazamiento hacia la derecha respecto del 21-mero típico (es decir, la hebra no codificante incluye nucleótidos en el lado derecho de la molécula cuando se

compara con el 21-mero típico); (b) las hebras pueden no ser completamente complementarias, es decir, las hebras pueden contener emparejamientos desemparejados sencillos; y (c) pueden incluirse modificaciones de bases, tales como ácidos nucleicos bloqueados en el extremo 5' de la hebra codificante.

- 5 En una tercera realización, la hebra codificante comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 28 nucleótidos (por ejemplo, 25, 26, 27, o 28 nucleótidos), en la que los 2 nucleótidos en el extremo 3' de la hebra codificante son desoxirribonucleótidos. La hebra codificante contiene un fosfato en el extremo 5'. La hebra no codificante comprende de aproximadamente 26 a aproximadamente 30 nucleótidos (por ejemplo, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos) y contiene un saliente 3' de 1-4 nucleótidos. Los nucleótidos que comprenden el saliente 3' se modifican con nucleótidos modificados con 2'OMe. La hebra no codificante contiene nucleótidos modificados con 2'OMe alternos que comienzan en el primer monómero de la hebra no codificante adyacente al saliente 3', y que se extienden 15-19 nucleótidos respecto del primer monómero adyacente al saliente 3'. Por ejemplo, para una hebra no codificante de 27 nucleótidos, y contando la primera base en el extremo 5' de la hebra no codificante como la posición número 1, podrían colocarse las modificaciones 2'OMe en las bases 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 26, y 27. En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene la siguiente estructura:

5' -pXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXDD-3'
3' -YXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXp-5'

- 20 en la que "X" = ARN, "p" = un grupo fosfato, "X" = 2'OMe ARN, "Y" es un dominio saliente formado por 1, 2, 3, o 4 monómeros de ARN que son opcionalmente monómeros de 2'OMe ARN, y "D" = ADN. La hebra superior es la hebra codificante, y la hebra inferior es la hebra no codificante.

- En una cuarta realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene varias propiedades que potencian su procesamiento por Dicer. De acuerdo con esta realización, el ARNbc tiene una longitud suficiente tal que se procesa por Dicer para producir un ARNpi y tiene al menos una de las siguientes propiedades: (i) el ARNbc es asimétrico, por ejemplo, tiene un saliente 3' en la hebra codificante; y (ii) el ARNbc tiene un extremo 3' modificado en la hebra no codificante para dirigir la orientación de la unión y el procesamiento por Dicer del ARNbc en un ARNpi activo. De acuerdo con esta realización, la hebra codificante comprende de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos (por ejemplo, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos) y la hebra no codificante comprende de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos (por ejemplo, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 nucleótidos). En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene un saliente en el extremo 3' de la hebra codificante. En otra realización, la hebra no codificante se modifica para la unión y procesamiento por Dicer mediante modificadores adecuados ubicados en el extremo 3' de la hebra no codificante. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos, tales como desoxirribonucleótidos, acilonucleótidos, y similares, y moléculas impedidas estéricamente, tales como moléculas fluorescentes y similares. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, estos reemplazan a los nucleótidos en el ARNbc, de tal forma que no cambia la longitud del ARNbc. En otra realización, el ARNbc tiene un saliente en el extremo 3' de la hebra codificante y la hebra no codificante se modifica para su procesamiento por Dicer. En una realización, la hebra no codificante tiene un fosfato 5'. Las hebras codificante y no codificante hibridan en condiciones biológicas, tales como las condiciones halladas en el citoplasma de una célula. Además, una región de una de las secuencias, particularmente de la hebra no codificante, del ARNbc tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos, en la que estos nucleótidos se encuentran adyacente al extremo 3' de la hebra no codificante y son lo suficientemente complementarios con una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana, tal como PLK-1. Además, de acuerdo con esta realización, el ARNbc sustrato de Dicer también puede tener una o más de las siguientes propiedades adicionales: (a) la hebra no codificante tiene un desplazamiento hacia la izquierda respecto del 21-mero típico (es decir, la hebra no codificante incluye nucleótidos en el lado izquierdo de la molécula cuando se compara con el 21-mero típico); y (b) las hebras pueden no ser completamente complementarias, es decir, las hebras pueden contener emparejamientos desemparejados sencillos.

- 50 En una realización preferida, el ARNbc sustrato de Dicer tiene una estructura asimétrica, teniendo una hebra codificante que tiene una longitud de 25 pares de bases, y teniendo la hebra no codificante una longitud de 27 pares de bases con un saliente 3' de 2 bases. En determinados casos, este ARNbc que tiene una estructura asimétrica contiene además 2 desoxinucleótidos en el extremo 3' de la hebra codificante en lugar de dos de los ribonucleótidos. En otros casos determinados, este ARNbc que tiene una estructura asimétrica contiene además modificaciones 2'OMe en las posiciones 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, y 25 de la hebra no codificante (en la que a primera base en el extremo 5' de la hebra no codificante es la posición 1). En determinados casos adicionales, este ARNbc que tiene una estructura asimétrica contiene además un saliente 3' en la hebra no codificante que comprende 1, 2, 3, o 4 nucleótidos de 2'OMe (por ejemplo, un saliente 3' de nucleótidos de 2'OMe en las posiciones 26 y 27 de la hebra no codificante).

- 60 En otra realización, pueden diseñarse ARNbc sustrato de Dicer seleccionando en primer lugar una hebra no codificante de la secuencia de ARNpi que tiene una longitud de al menos 19 nucleótidos. En algunos casos, el ARNpi no codificante se modifica para que incluya de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 ribonucleótidos en el extremo 5' para proporcionar una longitud de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos. Cuando la hebra no codificante tiene una longitud de 21 nucleótidos, 3-9, preferentemente 4-7, o más preferentemente 6 nucleótidos pueden añadirse en el extremo 5'. Aunque los ribonucleótidos añadidos pueden ser complementarios a

la secuencia génica diana, no se requiere una complementariedad completa entre la secuencia diana y el ARNpi no codificante. Esto es, el ARNpi no codificante resultante tiene una complementariedad suficiente con la secuencia diana. Entonces se produce una hebra codificante que tiene de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos. La hebra codificante es sustancialmente complementaria con la hebra no codificante como para hibridarse con la hebra no codificante en condiciones biológicas. En una realización, la hebra codificante se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para dirigir el procesamiento por Dicer de la hebra no codificante. En otra realización, la hebra no codificante del ARNbc tiene un saliente 3'. En una realización adicional, la hebra codificante se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para la unión y procesamiento por Dicer y la hebra no codificante del ARNbc tiene un saliente 3'.

En una realización relacionada, puede modificarse el ARNpi no codificante para que incluye de aproximadamente 5 a aproximadamente 9 ribonucleótidos en el extremo 1' para proporcionar una longitud de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos. Cuando la hebra no codificante tiene una longitud de 21 nucleótidos, 1-7, preferentemente 2-5, o más preferentemente 4 ribonucleótidos pueden añadirse en el extremo 3'. Los ribonucleótidos añadidos pueden tener cualquier secuencia. Aunque los ribonucleótidos añadidos pueden ser complementarios a la secuencia génica diana, no se requiere una complementariedad completa entre la secuencia diana y el ARNpi no codificante. Esto es, el ARNpi no codificante resultante tiene una complementariedad suficiente con la secuencia diana. Entonces se produce una hebra codificante que tiene de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos. La hebra codificante es sustancialmente complementaria con la hebra no codificante como para hibridarse con la hebra no codificante en condiciones biológicas. En una realización, la hebra no codificante se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para su procesamiento por Dicer. En otra realización, la hebra codificante del ARNbc tiene un saliente 3'. En una realización adicional, la hebra no codificante se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para la unión y procesamiento por Dicer y la hebra codificante del ARNbc tiene un saliente 3'.

Pueden identificarse, sintetizarse y modificarse secuencias de ARNbc sustrato de Dicer por cualquier medio conocido en la técnica para diseñar, sintetizar, y modificar secuencias de ARNpi. En realizaciones particulares, los ARNpi sustrato de Dicer se administran usando un sistema transportador, tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNpi sustrato de Dicer que se dirigen a uno o más genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular (por ejemplo, PLK-1); (b) uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o sales de los mismos, tal como se expone en el presente documento); (c) uno o más lípidos no catiónicos (por ejemplo, DPPC, DSPC, DSPE, y/o colesterol); y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA).

Las realizaciones adicionales relacionadas con los ARNbc sustrato de Dicer de la invención, así como los métodos para diseñar y sintetizar dichos ARNbc, se describen en las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20050244858, 20050277610, y 20070265220, y en la Solicitud de los Estados Unidos n.º 12/794.701, presentada el 4 de junio de 2010.

c) ARN en horquilla corta (ARNhc)

Un "ARN en horquilla pequeño" o "ARN en horquilla corta" o "ARNhc" incluye una secuencia corta de ARN que forma un giro estrecho en horquilla que puede usarse para silenciar la expresión génica mediante interferencia de ARN. Los ARNhc descritos en el presente documento pueden sintetizarse químicamente o transcribirse a partir de un casete transcripcional en un plásmido de ADN. La estructura de horquilla del ARNhc se escinde por la maquinaria celular en un ARNpi, que después se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

Los ARNhc descritos en el presente documento tienen típicamente aproximadamente 15-60, 15-50, o 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más típicamente aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud, y tienen preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNhc bicatenario tiene 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 nucleótidos de longitud, y el ARNhc bicatenario tiene aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25, o 19-25 pares de bases de longitud, preferentemente aproximadamente 18-22, 19-20, o 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARNhc pueden comprender salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos en la hebra no codificante y/o extremos de fosfato 5' en la hebra codificante. En algunas realizaciones, el ARNhc comprende una secuencia de hebra codificante y/o de hebra no codificante de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 15-60, 15-55, 15-50, 15-45, 15-40, 15-35, 15-30, o 15-25 nucleótidos de longitud), preferentemente, de aproximadamente 19 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 19-40, 19-35, 19-30, o 19-25 nucleótidos de longitud), más preferentemente, de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 19, 20, 21, 22, o 23 nucleótidos de longitud).

Los ejemplos no limitantes de ARNhc incluyen una molécula de polinucleótido bicatenaria ensamblada a partir de

una molécula monocatenaria, donde las regiones codificantes y no codificantes están enlazadas por un enlazador basado en ácidos nucleicos o no basado en ácidos nucleicos; y una molécula de polinucleótido bicatenaria con una estructura secundaria en horquilla que tiene regiones codificantes y no codificantes auto-complementarias. En realizaciones preferidas, las hebras codificante y no codificante del ARNhc se unen mediante una estructura de bucle que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 4 a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos.

Las secuencias adicionales de ARNhc incluyen, pero sin limitación, polinucleótidos asimétricos precursores de ARNhc, tales como aquellos descritos en las Publicaciones PCT n.º WO 2006/074108 y WO 2009/076321. Por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 2006/074108 divulga oligonucleótidos autoprotegidos que comprenden una región que tiene una secuencia complementaria a una, dos, tres, o más secuencias de ARNm diana iguales o diferentes (por ejemplo, ARNhc multivalentes) y una o más regiones autocomplementarias. De forma análoga, la Publicación PCT n.º WO 2009/076321 divulga polinucleótidos precursores asimétricos autoformantes que comprenden una región de direccionamiento que comprende una secuencia de polinucleótido complementaria a una región de una, dos, tres, o más secuencias de ARNm diana iguales o diferentes (por ejemplo, ARNhc multivalentes); una primera región autocomplementaria; y una segunda región autocomplementaria, en las que las regiones autocomplementarias primera y segunda se ubican una en cada extremo de la región de direccionamiento y ambas regiones autocomplementarias forman estructuras de tallo-bucle, en las que la primera región autocomplementaria puede escindirse por una endorribonucleasa RNasa III que no es una endorribonucleasa DICER de clase IV, y en las que ambas regiones autocomplementarias comprenden una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una región de la secuencia del gen diana, pero en la que una porción de la secuencia diana presente en la región de direccionamiento no tiene una secuencia complementaria en una cualquiera de las regiones autocomplementarias.

Las secuencias de ARNhc adecuadas pueden identificarse, sintetizarse, y modificarse usando cualquier medio conocido en la técnica para diseñar, sintetizar, y modificar secuencias de ARNpi. En realizaciones particulares descritas en el presente documento, los ARNhc se administran usando un sistema transportador, tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida descrita en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNhc que se dirigen a uno o más genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular (por ejemplo, PLK-1); (b) uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o sales de los mismos, tal como se expone en el presente documento); (c) uno o más lípidos no catiónicos (por ejemplo, DPPC, DSPC, DSPE, y/o colesterol); y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA).

Las realizaciones adicionales relacionadas con los ARNhc descritos en el presente documento, así como los métodos para diseñar y sintetizar dichos ARNhc, se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 12/794.701, presentada el 4 de junio de 2010.

d) ARNai

Al igual que el ARNpi, los ARN de interferencia asimétricos (ARNai) pueden reclutar al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y dar lugar a un silenciamiento eficaz de una diversidad de genes en células de mamífero mediando la escisión específica de secuencia de la secuencia diana entre el nucleótido 10 y 11 en relación al extremo 5' de la hebra no codificante (Sun et al., Nat. Biotech., 26:1379-1382 (2008)). Típicamente, una molécula de ARNai comprende un dúplex de ARN corto que tiene una hebra codificante y una hebra no codificante, en la que el dúplex contiene salientes en los extremos 3' y 5' de la hebra no codificante. El ARNai es generalmente asimétrico debido a que la hebra codificante es más corta en ambos extremos cuando se compara con la hebra no codificante complementaria. En algunos aspectos, pueden diseñarse, sintetizarse e hibridarse las moléculas de ARNai en condiciones similares a aquellas usadas para las moléculas de ARNpi. Como ejemplo no limitante, las secuencias de ARNai pueden seleccionarse y generarse usando los métodos descritos anteriormente para seleccionar secuencias de ARNpi.

En otra realización, los dúplex de ARNai de diversas longitudes (por ejemplo, aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17, o 14-17 pares de bases, más típicamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 pares de bases) pueden diseñarse con salientes en los extremos 3' y 5' de la hebra no codificante para que se dirijan a un ARNm de interés. En determinados casos, la hebra codificante del ARNai tiene aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17, o 14-17 nucleótidos de longitud, más típicamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 nucleótidos de longitud. En otros casos determinados, la hebra no codificante del ARNai tiene aproximadamente 15-60, 15-50, o 15-40 nucleótidos de longitud, más típicamente aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, y es preferentemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, el saliente no codificante 5' contiene uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no de direccionamiento (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", etc.). En otras realizaciones, el saliente no codificante 3' contiene

uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos no de direccionamiento (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", *etc.*). En determinados aspectos, las moléculas de ARNai descritas en el presente documento pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, por ejemplo, en la región bicatenaria (dúplex) y/o en los salientes no codificantes. Como ejemplo no limitante, las secuencias de ARNai pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para las secuencias de ARNai. En una realización preferida, la molécula de ARNai comprende nucleótidos de 2'OMe, tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, o mezclas de los mismos.

En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNai pueden comprender una hebra no codificante que corresponde a la hebra no codificante de una molécula de ARNpi, por ejemplo, una de las moléculas de ARNpi descritas en el presente documento. En realizaciones particulares descritas en el presente documento, los ARNai se administran usando un sistema transportador, tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida descrita en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNai que se dirigen a uno o más genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular (por ejemplo, PLK-1); (b) uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o sales de los mismos, tal como se expone en el presente documento); (c) uno o más lípidos no catiónicos (por ejemplo, DPPC, DSPC, DSPE, y/o colesterol); y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA).

Las secuencias de ARNai adecuadas pueden identificarse, sintetizarse, y modificarse usando cualquier medio conocido en la técnica para diseñar, sintetizar, y modificar secuencias de ARNpi. Las realizaciones adicionales relacionadas con las moléculas de ARNai descritas en el presente documento se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20090291131 y en la Publicación PCT n.º 09/127060.

e) miARN

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

Los genes que codifican los miARN son mucho más largos que la molécula madura de miARN procesada. Los miARN se transcriben en primer lugar en forma de transcritos primarios o pi-miARN con un tapón y una cola de poli-A y se procesan en estructuras de tallo-bucle cortas de ~70 nucleótidos, conocidas como pre-miARN en el núcleo de la célula. Este procesamiento se efectúa en los animales por un complejo de proteínas conocido como el complejo microprocesador, que consiste en la nucleasa Drosha y la proteína de unión a ARN bicatenario Pasha (Denli et al., *Nature*, 432:231-235 (2004)). Estos pre-miARN se procesan posteriormente en miARN maduro en el citoplasma mediante interacción con la endonucleasa Dicer, que también inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) (Bernstein et al., *Nature*, 409:363-366 (2001)). Tanto la hebra codificante como la hebra no codificante del ADN pueden funcionar como moldes para dar lugar al miARN.

Cuando Dicer escinde el tallo-bucle de miARN, se forman dos moléculas de ARN corto complementarias, pero solo una se integra en el complejo RISC. Esta hebra se conoce como la hebra guía y se selecciona por la proteína argonauta, la RNasa catalíticamente activa en el complejo RISC, basándose en la estabilidad del extremo 5' (Preall et al., *Curr. Biol.*, 16:530-535 (2006)). La hebra restante, conocida como la hebra anti-guía o pasajera, se degrada como un sustrato del complejo RISC (Gregory et al., *Cell*, 123:631-640 (2005)). Después de su integración en el complejo RISC activo, los miARN se emparejan por bases con sus moléculas de ARNm complementarias e inducen la degradación del ARNm diana y/o su silenciamiento traduccional.

Las moléculas de miARN de mamífero son normalmente complementarias a un sitio en la 3' UTR de la secuencia de ARNm diana. En determinados casos, la hibridación del miARN al ARNm diana inhibe la traducción de proteínas mediante el bloqueo de la maquinaria de traducción de proteínas. En otros casos determinados, la hibridación del miARN al ARNm diana facilita la escisión y degradación del ARNm diana mediante un proceso similar a la interferencia de ARN (iARN). Los miARN también pueden dirigirse a la metilación de sitios genómicos, que corresponden al ARNm diana. En general, el miARN funciona en asociación con un complemento de proteínas denominado de manera colectiva el miRNP.

En determinados aspectos, las moléculas de miARN descritas en el presente documento tienen aproximadamente 15-100, 15-90, 15-80, 15-75, 15-70, 15-60, 15-50, o 15-40 nucleótidos de longitud, más típicamente aproximadamente 15-30, 15-25, o 19-25 nucleótidos de longitud, y tienen preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 nucleótidos de longitud. En otros aspectos determinados, las moléculas de miARN pueden

comprender uno o más nucleótidos modificados. Como ejemplo no limitante, las secuencias de miARN pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para las secuencias de ARNi. En una realización preferida, la molécula de miARN comprende nucleótidos de 2'OMe, tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, o mezclas de los mismos.

5 En algunas realizaciones, pueden usarse las moléculas de miARN para silenciar la expresión de cualquiera de los genes diana descritos anteriormente para las secuencias de ARNi, y preferentemente silencian genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular. En realizaciones particulares descritas en el presente documento, los miARN se administran usando un sistema transportador, tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida descrita en el presente documento, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de miARN que se dirigen a uno o más genes asociados con la proliferación celular, la tumorigénesis, y/o la transformación celular (por ejemplo, PLK-1); (b) uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o sales de los mismos, tal como se expone en el presente documento); (c) uno o más lípidos no catiónicos (por ejemplo, DPPC, DSPC, DSPE, y/o colesterol); y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido que tienen un peso molecular medio de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, tal como PEG750-C-DMA).

20 En otras realizaciones, se administran uno o más agentes que bloquean la actividad de un miARN que se dirige a un ARNm de interés (por ejemplo, ARNm de PLK-1) usando una partícula lipídica de la invención (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido, tal como SNALP). Los ejemplos de agentes bloqueantes incluyen, pero sin limitación, oligonucleótidos de bloqueo estérico, oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueado, y oligonucleótidos de morfolino. Dichos agentes bloqueantes pueden unirse directamente al miARN o al sitio de unión a miARN en el ARNm diana.

25 Las realizaciones adicionales relacionadas con las moléculas de miARN descritas en el presente documento se describen en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20090291131 y en la Publicación PCT n.º 09/127060.

30 **f) Oligonucleótidos no codificantes**

En una realización descrita en el presente documento, el ácido nucleico es un oligonucleótido no codificante dirigido a un gen o secuencia diana de interés. Las expresiones "oligonucleótido no codificante" o "no codificante" incluyen oligonucleótidos que son complementarios a una secuencia de polinucleótido diana. Los oligonucleótidos no codificantes son hebras individuales de ADN o ARN que son complementarias a una secuencia seleccionada. Los oligonucleótidos de ARN no codificantes impiden la traducción de hebras de ARN complementarias mediante su unión al ARN. Pueden usarse oligonucleótidos de ADN no codificantes para dirigirse a un ARN específico, complementario (codificante o no codificante). En caso de que se produzca la unión, este híbrido de ADN/ARN puede degradarse por la enzima RNasa H. En una realización particular, los oligonucleótidos no codificantes comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El término también abarca oligonucleótidos no codificantes que pueden no ser exactamente complementarios al gen diana deseado. Por lo tanto, la invención puede utilizarse en casos donde las actividades no diana específicas se encuentran en la secuencia no codificante, o donde se prefiere para un uso particular una secuencia no codificante que contiene uno o más desajustes con la secuencia diana.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos no codificantes son inhibidores eficaces y dirigidos de la síntesis de proteínas, y, por consiguiente, pueden usarse para inhibir de manera específica la síntesis de proteínas por un gen diana. La eficacia de los oligonucleótidos no codificantes para inhibir la síntesis de proteínas está bien establecida. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y del receptor de acetilcolina muscarínico de tipo 2 se inhibe mediante oligonucleótidos no codificantes dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (véanse, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.739.119 y 5.759.829). Además, se han demostrado ejemplos de inhibición no codificante con la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia a múltiples fármacos (MDR1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABAA estriatal, y EGF humano (véase, Jaskulski et al., Science, 240:1544-6 (1988); Vasanthakumar et al., Cancer Commun., 1:225-32 (1989); Peris et al., Brain Res Mol brain Res., 15:57:310-20 (1998); y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.801.154; 5.789.573; 5.718.709 y 5.610.288). Además, también se han descrito construcciones no codificantes que inhiben y que pueden usarse para tratar una diversidad de proliferaciones celulares anormales, por ejemplo, el cáncer (véanse, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.747.470; 5.591.317; y 5.783.683).

Los métodos para producir oligonucleótidos no codificantes se conocen en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para producir un oligonucleótido no codificante que se dirige a cualquier secuencia de polinucleótido. La selección de secuencias de oligonucleótido no codificantes específicas para una secuencia diana dada se basa en el análisis de la secuencia diana seleccionada y en la determinación de la estructura secundaria, la T_m , la energía de unión, y la estabilidad relativa. Pueden seleccionarse oligonucleótidos no codificantes basándose en su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas, u otras estructuras secundarias que podrían reducir o impedir la unión específica al ARNm diana en una célula hospedadora. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas

regiones en o próximas al codón de inicio de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm. Pueden efectuarse estos análisis de la estructura secundaria y las consideraciones para la selección del sitio diana, por ejemplo, usando la v.4 del programa de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el programa informático del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-402 (1997)).

g) Ribozimas

De acuerdo con otra realización descrita en el presente documento, las partículas de ácido nucleico-lípido se asocian con ribozimas. Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad de endonucleasa (véase, Kim et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 84:8788-92 (1987); y Forster et al., Cell, 49:211-20 (1987)). Por ejemplo, un gran número de ribozimas aceleran las reacciones de transferencia de fosfoéster con un alto grado de especificidad, a menudo escindiendo solo uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (véase, Cech et al., Cell, 27:487-96 (1981); Michel et al., J. Mol. Biol., 216:585-610 (1990); Reinhold-Hurek et al., Nature, 357:173-6 (1992)). Esta especificidad se ha atribuido a la necesidad de que el sustrato se una mediante interacciones de emparejamiento de bases específicas con la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

En la actualidad se conocen al menos seis variedades básicas de moléculas de ARN enzimáticas de origen natural. Cada una puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster del ARN *in trans* (y por lo tanto pueden escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose en primer lugar a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión a la diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una parte enzimática de la molécula que actúa escindiendo el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático reconoce en primer lugar y después se une a un ARN diana mediante emparejamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido a y escindido su diana de ARN, este se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse a y escindir nuevas dianas de manera repetida.

La molécula de ácido nucleico enzimática puede formarse en un motivo hammerhead, de horquilla, del virus de la hepatitis δ , de un intrón del grupo I o de ARN de RNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN), o de ARN VS de Neurospora, por ejemplo. Los ejemplos específicos de motivos de hammerhead se describen en, por ejemplo, Rossi et al., Nucleic Acids Res., 20:4559-65 (1992). Los ejemplos de motivos de horquilla se describen en, por ejemplo, el documento EP 0360257, Hampel et al., Biochemistry, 28:4929-33 (1989); Hampel et al., Nucleic Acids Res., 18:299-304 (1990); y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.631.359. Un ejemplo de motivo del virus de la hepatitis δ se describe en, por ejemplo, Perrotta et al., Biochemistry, 31:11843-52 (1992). Un ejemplo del motivo de RNasaP se describe en, por ejemplo, Guerrier-Takada et al., Cell, 35:849-57 (1983). Los ejemplos de motivo de ribozima de ARN VS de Neurospora se describen en, por ejemplo, Saville et al., Cell, 61:685-96 (1990); Saville et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8826-30 (1991); Collins et al., Biochemistry, 32:2795-9 (1993). Un ejemplo del intrón del grupo I se describe en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.987.071. Las características importantes de las moléculas de ácido nucleico enzimáticas usadas tal como se describe en el presente documento es que pueden tener un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ADN o ARN del gen diana, y que tienen secuencias de nucleótidos dentro de o rodeando al sitio de unión a sustrato que confieren actividad de escisión de ARN a la molécula. Por lo tanto, las construcciones de ribozima no necesitan estar limitadas a los motivos específicos mencionados en el presente documento.

Se conocen en la técnica métodos para producir una ribozima dirigida a cualquier secuencia de polinucleótido. Las ribozimas pueden diseñarse tal como se describe en, por ejemplo, las Publicaciones PCT n.º WO 93/23569 y WO 94/02595, y se sintetizan para ensayarlas *in vitro* y/o *in vivo* tal como se describe en las mismas.

Puede optimizarse la actividad de la ribozima alterando la longitud de los brazos de unión de la ribozima o sintetizando las ribozimas químicamente con modificaciones que previenen su degradación por ribonucleasas séricas (véase, por ejemplo, las Publicaciones PCT n.º WO 92/07065, WO 93/15187, WO 91/03162, y WO 94/13688; el documento EP 92110298.4; y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.334.711, que describe varias modificaciones químicas que pueden efectuarse en los restos de azúcar de las moléculas de ARN enzimáticas), modificaciones que potencian su eficacia en las células, y la retirada de las bases II del tallo para acortar los tiempos de síntesis del ARN y reducir las necesidades químicas.

h) Oligonucleótidos inmunoestimuladores

Los ácidos nucleicos asociados con partículas lipídicas descritas en el presente documento pueden ser inmunoestimuladores, incluyendo oligonucleótidos inmunoestimuladores (ISS; mono o bicatenarios) capaces de inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a un sujeto, que puede ser un mamífero, tal como un ser humano. Los ISS incluyen, por ejemplo, determinados palíndromos que dan lugar a estructuras secundarias de horquilla (véase, Yamamoto et al., J. Immunol., 148:4072-6 (1992)), o motivos de CpG, así como otras

características de ISS (tales como dominios de multi-G; véase; la Publicación PCT n.º WO 96/11266).

Se considera que los ácidos nucleicos inmunoestimuladores no son específicos de secuencia cuando no es necesario que se unan específicamente a y reduzcan la expresión de una secuencia diana para provocar una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, determinados ácidos nucleicos inmunoestimuladores pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen o ARNm de origen natural, pero aún pueden considerarse ácidos nucleicos inmunoestimuladores no específicos de secuencia.

En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido de CpG. El oligonucleótido o el dinucleótido de CpG puede estar no metilado o metilado. En otra realización, el ácido nucleico inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido de CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un solo dinucleótido de CpG, en el que la citosina en el dinucleótido de CpG está metilada. En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos de CpG, en el que al menos una citosina en el dinucleótido de CpG está metilada. En una realización adicional, está metilada cada citosina en los dinucleótidos de CpG presentes en la secuencia. En otra realización, el ácido nucleico comprende una diversidad de dinucleótidos de CpG, en el que al menos uno de los dinucleótidos de CpG comprende una citosina metilada. Los ejemplos de oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención se describen en las Publicaciones PCT n.º WO 02/069369, WO 01/15726, y WO 09/086558; la Patente de los Estados Unidos n.º 6.406.705; y Raney et al., J. Pharm. Exper. Ther., 298:1185-92 (2001). En determinadas realizaciones, los oligonucleótidos usados en las composiciones y métodos descritos en el presente documento tienen una cadena principal de fosfodiéster ("PO") o una cadena principal de fosforotioato ("PS"), y/o al menos un resto de citosina metilado en un motivo de CpG.

2. Otros agentes activos

En determinadas realizaciones, el agente activo asociado con las partículas lipídicas descritas en el presente documento puede comprender una o más proteínas terapéuticas, polipéptidos, o moléculas o compuestos orgánicos pequeños. Los ejemplos no limitantes de dichos agentes o fármacos terapéuticamente eficaces incluyen fármacos para oncología (por ejemplo, fármacos para quimioterapia, agentes terapéuticos hormonales, agentes inmunoterapéuticos, agentes radioterapéuticos, etc.), agentes reductores de lípidos, fármacos antivíricos, compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación para el control de la natalidad, antipiréticos, vasodilatadores, anti-angiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de transducción de señales, fármacos cardiovasculares, tales como agentes anti-arrítmicos, hormonas, vasoconstrictores, y esteroides. Estos agentes activos pueden administrarse solos en las partículas lipídicas descritas en el presente documento, o en combinación (por ejemplo, administrarse conjuntamente) con las partículas lipídicas descritas en el presente documento que comprenden ácido nucleico, tal como ARN de interferencia.

Los ejemplos no limitantes de fármacos quimioterapéuticos incluyen fármacos basados en platino (por ejemplo, oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iroplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (taxol), docetaxel, etc.), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, irinotecán (CPT-11; Camptosar), topotecán, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorrubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), inhibidores de tirosina cinasa (por ejemplo, gefitinib (Iressa[®]), sunitinib (Sutent[®]; SU11248), erlotinib (Tarceva[®]; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec[®]; STI571), dasatinib (BMS-354825), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima[™]; ZD6474), etc.), sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y combinaciones de los mismos.

Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales convencionales incluyen, sin limitación, esteroides (por ejemplo, dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasa, tamoxifeno, y goserelina, así como otros agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).

Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos convencionales incluyen, pero sin limitación, inmunoestimulantes (por ejemplo, Bacilo Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, interferón alfa, etc.), anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-HER2, anti-CD52, anti-HLA-DR, y anti-VEGF), inmunotoxinas (por ejemplo, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliceamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de pseudomonas, etc.), y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado a ¹¹¹In, ⁹⁰Y, o ¹³¹I, etc.).

Los ejemplos de agentes radioterapéuticos convencionales incluyen, pero sin limitación, radionúclidos, tales como ⁴⁷Sc, ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁸⁹Sr, ⁸⁶Y, ⁸⁷Y, ⁹⁰Y, ¹⁰⁵Rh, ¹¹¹Ag, ¹¹¹In, ^{117m}Sn, ¹⁴⁹Pm, ¹⁵³Sm, ¹⁶⁶Ho, ¹⁷⁷Lu, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ²¹¹At, y ²¹²Bi, conjugados opcionalmente a anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.

Los fármacos para oncología adicionales que pueden usarse de acuerdo con la invención incluyen, pero sin limitación, alkeran, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, bexaroteno, biCNU, carmustina, CCNU, celecoxib, cladribina, ciclosporina A, arabinósido de citosina, citoxano, dexrazoxano, DTIC, estramustina, exemestano, FK506, gemtuzumab-ozogamicina, hidrea, hidroxuurea, idarrubicina, Interferón, letrozol, leustatina, leuprolida, litretinoína, megastrol, L-PAM, mesna, metoxsalen, mitramicina, mostaza de nitrógeno, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfímero sódico, prednisona, rituxano, estreptozocina, STI-571, taxotere, temozolomida, VM-26, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, y velban. Otros ejemplos de fármacos para oncología que pueden usarse de acuerdo con la invención son elipticina y análogos o derivados de elipticina, eptilonas, inhibidores de cinasas intracelulares, y camptotecinas.

Los ejemplos no limitantes de agentes reductores de lípidos para tratar una enfermedad o trastorno lipídico asociado con un aumento de los triglicéridos, colesterol, y/o glucosa incluyen estatinas, fibratos, ezetimibe, tiazolidindionas, niacina, betabloqueantes, nitroglicerina, antagonistas de calcio, aceite de pescado, y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de fármacos antivíricos incluyen, pero sin limitación, abacavir, aciclovir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, arbidol, atazanavir, atripla, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, inhibidores de la entrada, famciclovir, combinaciones a dosis fija, fomivirsén, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, inhibidores de la fusión, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidores de la integrasa, interferón de tipo III (por ejemplo, moléculas de IFN- β tales como IFN- β 1, IFN- β 2, e IFN- β 3), interferón de tipo II (por ejemplo, IFN- γ), interferón de tipo I (por ejemplo, IFN- α , tal como IFN- α PEGilado, IFN- β , IFN- κ , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- β , IFN- ω , e IFN- ζ), Interferón, lamivudina, lopinavir, lovirida, MK-0518, maraviroc, moroxidina, nelfinavir, nevirapina, nexavir, análogos de nucleósidos, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la retrotranscriptasa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, potenciadores sinérgicos, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamavir, zidovudina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y mezclas de los mismos.

B. Lípidos catiónicos

Puede usarse cualquiera de los lípidos catiónicos de fórmula I-XVI o las sales de los mismos tal como se exponen en el presente documento en las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP), ya estén solos o en combinación con una o más especies de lípido catiónico o especies de lípido no catiónico diferentes. Los lípidos catiónicos incluyen los enantiómeros (R) y/o (S) de los mismos.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico comprende una mezcla racémica. En otras realizaciones, el lípido catiónico comprende una mezcla de uno o más diastereómeros. En determinadas realizaciones, el lípido catiónico está enriquecido respecto de un enantiómero, de tal forma que el lípido catiónico comprende al menos aproximadamente un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de exceso enantiomérico. En otras realizaciones determinadas, el lípido catiónico está enriquecido respecto de un diastereómero, de tal forma que el lípido catiónico comprende al menos aproximadamente un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de exceso diastereomérico. En determinadas realizaciones adicionales, el lípido catiónico es quiralmente puro (por ejemplo, comprende un solo isómero óptico). En realizaciones adicionales, el lípido catiónico está enriquecido respecto de un isómero óptico (por ejemplo, un isómero ópticamente activo), de tal forma que el lípido catiónico comprende al menos aproximadamente un 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de exceso isomérico. En el presente documento se describe la síntesis de los lípidos catiónicos de las fórmulas I-XVI en forma de una mezcla racémica o en una forma ópticamente pura.

Las expresiones "lípido catiónico" y "aminolípido" se usan de manera indistinta en el presente documento para incluir aquellos lípidos y sales de los mismos que tienen una, dos, tres, o más cadenas de ácido graso o cadenas de alquilo y un grupo de cabeza amino titulable por pH (por ejemplo, un grupo de cabeza alquilamino o dialquilamino). El lípido catiónico está típicamente protonado (es decir, cargado positivamente) a un pH por debajo del pK_a del lípido catiónico y es sustancialmente neutro a un pH por encima del pK_a . Los lípidos catiónicos de la invención también pueden denominarse lípidos catiónicos titulables.

El término "sales" incluye cualquier complejo aniónico y catiónico, tal como el complejo formado entre un lípido catiónico divulgado en el presente documento y uno o más aniones. Los ejemplos no limitantes de aniones incluyen aniones inorgánicos y orgánicos, por ejemplo, hidruro, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, oxalato (por ejemplo, hemioxalato), fosfato, fosfonato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, óxido, carbonato, bicarbonato, nitrato, nitrito, nitruro, bisulfito, sulfuro, sulfito, bisulfato, sulfato, tiosulfato, hidrogenosulfato, borato, formiato, acetato, benzoato, citrato, tartrato, lactato, acrilato, poliácilato, fumarato, maleato, itaconato, glicolato, gluconato, malato, mandelato, tiglato, ascorbato, salicilato, polimetacrilato, perclorato, clorato, clorito, hipoclorito, bromato, hipobromito, yodato, un alquilsulfonato, un arilsulfonato, arseniato, arsenito, cromato, dicromato, cianuro, cianato, tiocianato, hidróxido, peróxido, permanganato, y mezclas de los mismos. En realizaciones particulares, las sales de los lípidos catiónicos divulgadas en el presente documento son sales cristalinas.

El término "alquilo" incluye un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificada, cíclico o no cíclico, de 1 a 24 átomos de carbono. Los alquilos saturados de cadena lineal representativos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, y similares, mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen, sin limitación, isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo, y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen, pero sin limitación, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, y similares, mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen, sin limitación, ciclopentenilo, ciclohexenilo, y similares.

El término "alquenilo" incluye un alquilo, como se ha definido anteriormente, que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenilos incluyen isómeros tanto *cis* como *trans*. Los alquenilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen, pero sin limitación, etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutilenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares.

El término "alquinilo" incluyen cualquier alquilo o alquenilo, como se ha definido anteriormente, que contiene adicionalmente al menos un enlace triple entre carbonos adyacentes. Los alquinilos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen, sin limitación, acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares.

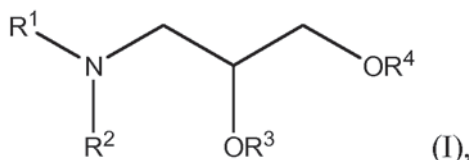
El término "acilo" incluye cualquier alquilo, alquenilo, o alquinilo en el que el carbono en el punto de unión está sustituido por un grupo oxo, tal como se define a continuación. Los siguientes son ejemplos no limitantes de grupos acilo: -C(=O)alquilo, -C(=O)alquenilo, y -C(=O)alquinilo.

El término "heterociclo" incluye un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 7 a 10 miembros que está saturado, insaturado o es aromático, y que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y en el que los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores están fusionados a un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido a través de cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen, pero sin limitación, heteroarilos tal como se definen más adelante, así como morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropirranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopirranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopirranilo, y similares.

Las expresiones "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido", y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando están sustituidos, se reemplaza al menos un átomo de hidrógeno con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se reemplazan dos átomos de hidrógeno. A este respecto, los sustituyentes incluyen, pero sin limitación, oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR^x, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x, y -SO_nNR^xR^y, en los que n es 0, 1, o 2, R^x y R^y son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo, o heterociclo, y cada uno de los sustituyentes alquilo y heterociclo pueden estar sustituidos adicionalmente con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR^x, heterociclo, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x, y -SO_nNR^xR^y. La expresión "opcionalmente sustituido", cuando se usa antes de una lista de sustituyentes, significa que cada uno de los sustituyentes en la lista puede estar opcionalmente sustituido, tal como se describe en el presente documento.

El término "halógeno" incluye flúor, cloro, bromo, y yodo.

En un aspecto, los lípidos catiónicos de fórmula I que tienen la siguiente estructura (o sales de los mismos) son útiles en la presente invención:



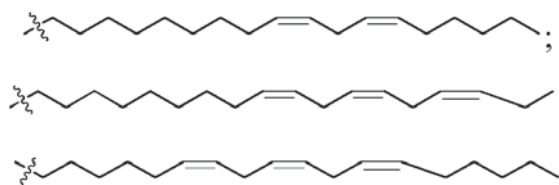
en la que R¹ y R² son iguales o diferentes y son independientemente H o un alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido, o R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno y oxígeno; R³ y R⁴ son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₄, alquenilo C₁₂-C₂₄, alquinilo C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido; y al menos uno de R³ y R⁴ comprende al menos dos sitios de insaturación.

En algunas realizaciones, R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄ opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R¹ y R² son ambos grupos metilo.

En otras realizaciones, R³ y R⁴ son independientemente un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o acilo C₁₂-C₂₄, C₁₂-

C₂₂, C₁₂-C₂₀, C₁₄-C₂₄, C₁₄-C₂₂, C₁₄-C₂₀, C₁₆-C₂₄, C₁₆-C₂₂ o C₁₆-C₂₀ opcionalmente sustituido (es decir, un grupo alquilo, alqueno, alquino o acilo C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃ o C₂₄). En determinadas realizaciones, al menos uno o ambos de R³ y R⁴ comprende independientemente al menos 2, 3, 4, 5, o 6 sitios de insaturación (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 2-3, 2-4, 2-5, o 2-6 sitios de insaturación). En determinados casos, R³ y R⁴ pueden comprender independientemente un resto de dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, o un derivado de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenilo, γ-linolenilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En realizaciones particulares, R³ y R⁴ son ambos restos de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ-linolenilo. En realizaciones particulares, R³ y R⁴ son ambos restos de linolenilo o restos de γ-linolenilo. En determinados casos, R³ y R⁴ son diferentes, por ejemplo, R³ es un tetradecatrienilo (C₁₄) y R⁴ es linoleilo (C₁₈). En una realización preferida, el lípido catiónico de fórmula I es simétrico, es decir, R³ y R⁴ son ambos iguales. En realizaciones adicionales, los dobles enlaces presentes en uno o ambos de R³ y R⁴ pueden encontrarse en la configuración *cis* y/o *trans*.

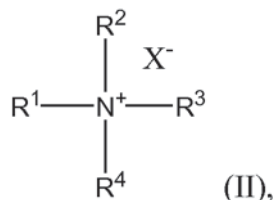
En algunos grupos de realizaciones para los lípidos catiónicos de fórmula I, R³ y R⁴ son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en:



En realizaciones particulares, el lípido catiónico de fórmula I comprende 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), o mezclas de los mismos.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula I forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula I es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

En otro aspecto, los lípidos catiónicos de fórmula II que tienen la siguiente estructura (o sales de los mismos) son útiles en la presente invención:

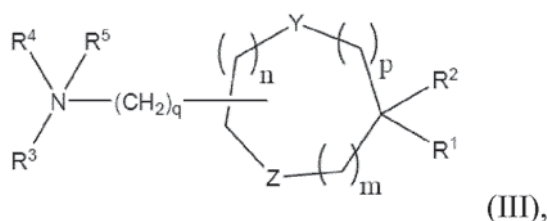


en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente y son H o alquilo C₁-C₃, R³ y R⁴ se seleccionan independientemente y son grupos alquilo que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 átomos de carbono, y al menos uno de R³ y R⁴ comprende al menos dos sitios de insaturación. En determinados casos, R³ y R⁴ son ambos iguales, es decir, R³ y R⁴ son ambos linoleilo (C₁₈), etc. En otros casos, R³ y R⁴ son diferentes, es decir, R³ es tetradecatrienilo (C₁₄) y R⁴ es linoleilo (C₁₈). En una realización preferida, el lípido catiónico de fórmula II es simétrico, es decir, R³ y R⁴ son ambos iguales. En otra realización preferida, tanto R³ como R⁴ comprenden al menos dos sitios de insaturación. En algunas realizaciones, R³ y R⁴ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en dodecadienilo, tetradecadienilo, hexadecadienilo, linoleilo, e icosadienilo. En una realización preferida, R³ y R⁴ son ambos linoleilo. En algunas realizaciones, R³ y R⁴ comprenden al menos tres sitios de insaturación y se seleccionan independientemente entre, por ejemplo, dodecatrienilo, tetradecatrienilo, hexadecatrienilo, linolenilo, e icosatrienilo.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula II forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula II es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

La síntesis de lípidos catiónicos, tales como DLinDMA y DLenDMA, así como lípidos catiónicos adicionales dentro del alcance de las fórmulas I e II, se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20060083780.

En otro aspecto más, los lípidos catiónicos de fórmula III que tienen la siguiente estructura (o sales de los mismos) son útiles en la presente invención:



5 en la que R¹ y R² son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₄, alquenilo C₁₂-C₂₄, alquinilo C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido; R³ y R⁴ son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido, o R³ y R⁴ pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno y oxígeno; R⁵ está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; m, n, y p son iguales o diferentes y son independientemente cualquiera de 0, 1, o 2, con la salvedad de que m, n, y p no son simultáneamente 0; q es 0, 1, 2, 3, o 4; e Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente O, S, o NH.

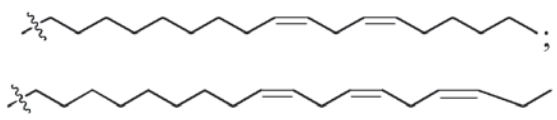
10 En algunas realizaciones, R³ y R⁴ son independientemente un alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄ opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R³ y R⁴ son ambos grupos metilo. En una realización, q es 1 o 2. En otra realización, q es 1-2, 1-3, 1-4, 2-3, o 2-4. En realizaciones adicionales, R⁵ está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R⁵ es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R⁵ es un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, Y y Z son ambos O.

15 En otras realizaciones, R¹ y R² son independientemente un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o acilo C₁₂-C₂₄, C₁₂-C₂₂, C₁₂-C₂₀, C₁₄-C₂₄, C₁₄-C₂₂, C₁₄-C₂₀, C₁₆-C₂₄, C₁₆-C₂₂ o C₁₆-C₂₀ opcionalmente sustituido (es decir, un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o acilo C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃ o C₂₄). En determinadas realizaciones, al menos uno o ambos de R¹ y R² comprende independientemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sitios de insaturación (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 2-3, 2-4, 2-5, o 2-6 sitios de insaturación) o un grupo alquilo o acilo sustituido. En determinados casos, la cadena lateral insaturada puede comprender un resto de miristoleilo, un resto de palmitoleilo, un resto de oleilo, un resto de dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, o un derivado de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenilo, γ-linolenilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En realizaciones particulares, R¹ y R² son ambos restos de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ-linolenilo. En realizaciones particulares, R¹ y R² son ambos restos de linolenilo o restos de γ-linolenilo.

20 En las realizaciones donde uno o ambos de R¹ y R² comprenden independientemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sitios de insaturación, los dobles enlaces presentes en uno o ambos de R¹ y R² pueden encontrarse en la configuración *cis* y/o *trans*. En determinados casos, R¹ y R² son ambos iguales, por ejemplo, R¹ y R² son ambos restos de linoleilo (C₁₈), etc. En otros casos, R¹ y R² son diferentes, por ejemplo, R¹ es un resto de tetradecatrienilo (C₁₄) y R² es un resto de linoleilo (C₁₈). En una realización preferida, el lípido catiónico de fórmula III es simétrico, es decir, R¹ y R² son ambos iguales. En otra realización preferida, al menos uno o ambos de R¹ y R² comprende al menos dos sitios de insaturación (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 2-3, 2-4, 2-5, o 2-6 sitios de insaturación).

25 En las realizaciones donde uno o ambos de R¹ y R² comprenden independientemente un grupo alquilo o acilo ramificado (por ejemplo, un grupo alquilo o acilo sustituido), el grupo alquilo o acilo ramificado puede comprender un alquilo o acilo C₁₂-C₂₄ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C₁-C₆. En realizaciones particulares, el grupo alquilo o acilo ramificado comprende un alquilo o acilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). En algunas realizaciones, el grupo alquilo ramificado comprende un resto de fitanilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanilo) y el grupo acilo ramificado comprende un resto fitanoilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoilo). En realizaciones particulares, R¹ y R² son ambos restos fitanilo.

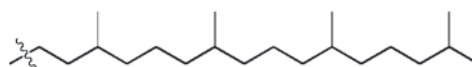
30 En algunos grupos de realizaciones para los lípidos catiónicos de fórmula III, R¹ y R² son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en:



55



y



5

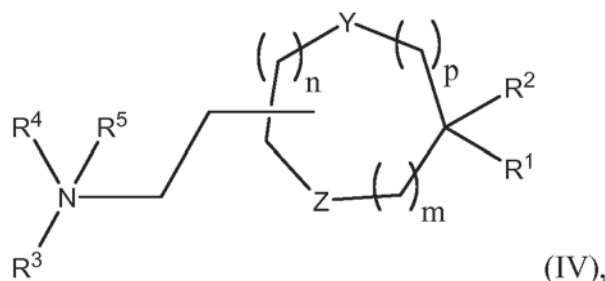
En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos que se encuentran dentro del alcance de la fórmula III incluyen, pero sin limitación, los siguientes: 2,2-dilinoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2" o "C2K"), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-dilinoil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-dilinoil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dioleil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DO-K-DMA), 2,2-diestearoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DS-K-DMA), 2,2-dilinoil-4-N-morfolino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MA), cloruro de 2,2-dilinoil-4-trimetilamino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-TMA.Cl), 2,2-dilinoil-4,5-bis(dimetilaminometil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K²-DMA), 2,2-dilinoil-4-metilpiperazin-[1,3]-dioxolano (D-Lin-K-N-metilpiperazina), DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DPan-C2K-DMA, DPan-C3K-DMA, o mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el lípido catiónico de fórmula III comprende DLin-K-C2-DMA y/o DLin-K-DMA.

En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos de fórmula III forman una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula III es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

La síntesis de lípidos catiónicos, tales como DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.Cl, DLin-K²-DMA, D-Lin-K-N-metilpiperazina, así como de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación PCT n.º WO 2010/042877.

La síntesis de lípidos catiónicos, tales como DLin-K-DMA, así como de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación PCT n.º WO 09/086558.

En una realización preferida, los lípidos catiónicos de fórmula IV que tienen la siguiente estructura (o sales de los mismos) son útiles en la presente invención:



en la que R¹ y R² son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₄, alquenilo C₁₂-C₂₄, alquinilo C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido; R³ y R⁴ son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido, o R³ y R⁴ pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre nitrógeno y oxígeno; R⁵ está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; m, n, y p son iguales o diferentes y son independientemente cualquiera de 0, 1, o 2, con la salvedad de que m, n, y p no son simultáneamente 0; e Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente O, S, o NH.

En algunas realizaciones, R³ y R⁴ son independientemente un alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄ opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R³ y R⁴ son ambos grupos metilo. En realizaciones adicionales, R⁵ está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R⁵ es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R⁵ es un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, Y y Z son ambos O.

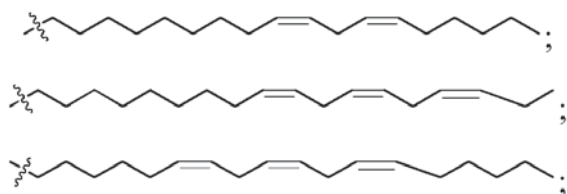
En otras realizaciones, R¹ y R² son independientemente un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o acilo C₁₂-C₂₄, C₁₂-C₂₂, C₁₂-C₂₀, C₁₄-C₂₄, C₁₄-C₂₂, C₁₄-C₂₀, C₁₆-C₂₄, C₁₆-C₂₂ o C₁₆-C₂₀ opcionalmente sustituido (es decir, un grupo alquilo, alquenilo, alquinilo o acilo C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅, C₁₆, C₁₇, C₁₈, C₁₉, C₂₀, C₂₁, C₂₂, C₂₃ o C₂₄). En determinadas realizaciones, al menos uno o ambos de R¹ y R² comprende independientemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sitios de insaturación (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6, 2-3, 2-4, 2-5, o 2-6 sitios de insaturación) o un grupo alquilo o acilo sustituido. En determinados casos, la cadena lateral insaturada puede comprender un resto de miristoleilo, un resto de palmitoleilo, un resto de oleilo, un resto de dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de

5 hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, o un derivado de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleilo, linolenilo, γ -linolenilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En realizaciones particulares, R^1 y R^2 son ambos restos de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R^1 y R^2 son ambos restos de linolenilo o restos de γ -linolenilo.

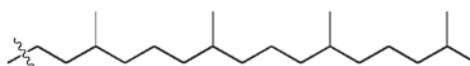
10 En las realizaciones donde uno o ambos de R^1 y R^2 comprenden independientemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sitios de insaturación, los dobles enlaces presentes en uno o ambos de R^1 y R^2 pueden encontrarse en la configuración *cis* y/o *trans*. En determinados casos, R^1 y R^2 son ambos iguales, por ejemplo, R^1 y R^2 son ambos restos de linoleilo (C_{18}), etc. En otros casos, R^1 y R^2 son diferentes, por ejemplo, R^1 es un resto de tetradecatrienilo (C_{14}) y R^2 es un resto de linoleilo (C_{18}). En una realización preferida, el lípido catiónico de fórmula IV es simétrico, es decir, R^1 y R^2 son ambos iguales. En otra realización preferida, al menos uno o ambos de R^1 y R^2 comprende al menos dos sitios de insaturación (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 2-3, 2-4, 2-5, o 2-6 sitios de insaturación).

15 En las realizaciones donde uno o ambos de R^1 y R^2 comprenden independientemente un grupo alquilo o acilo ramificado (por ejemplo, un grupo alquilo o acilo sustituido), el grupo alquilo o acilo ramificado puede comprender un alquilo o acilo C_{12} - C_{24} que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C_1 - C_6 . En realizaciones particulares, el grupo alquilo o acilo ramificado comprende un alquilo o acilo C_{12} - C_{20} o C_{14} - C_{22} con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C_1 - C_4 (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). En algunas realizaciones, el grupo alquilo ramificado comprende un resto de fitanilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanilo) y el grupo acilo ramificado comprende un resto fitanoilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoilo). En realizaciones particulares, R^1 y R^2 son ambos restos fitanilo.

25 En algunos grupos de realizaciones para los lípidos catiónicos de fórmula IV, R^1 y R^2 son iguales o diferentes y se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en:



y

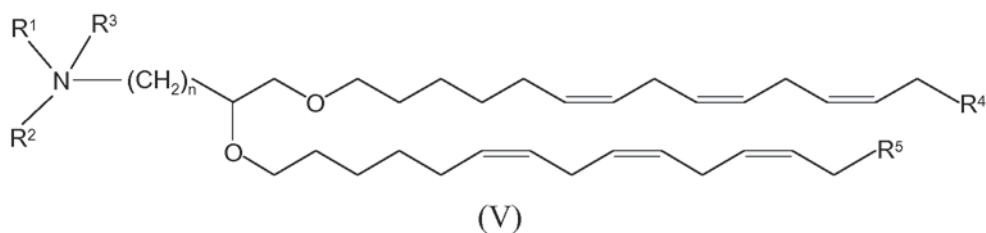


40 En determinadas realizaciones, los lípidos catiónicos que se encuentran dentro del alcance de la fórmula IV incluyen, pero sin limitación, los siguientes: 2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2" o "C2K"), DLen-C2K-DMA, γ -DLen-C2K-DMA, DPan-C2K-DMA, o mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el lípido catiónico de fórmula IV comprende DLin-K-C2-DMA.

45 En algunas realizaciones, los lípidos catiónicos de fórmula IV forman una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula IV es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

La síntesis de DLin-K-C2-DMA (C2K) se describe en la Publicación PCT n.º WO 2010/042877.

50 En un aspecto adicional, los lípidos catiónicos de fórmula V que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



55 o sales de los mismos, en la que: R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1 - C_6 , alquenilo C_2 - C_6 o alquinilo C_2 - C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo

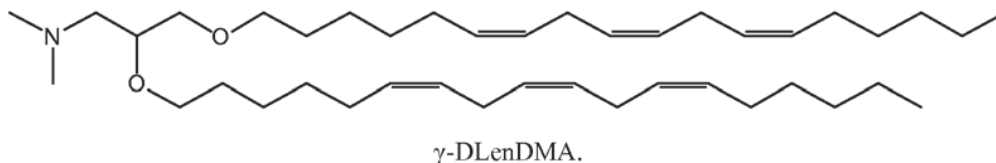
heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R³ está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; R⁴ y R⁵ están ausentes o presentes y cuando están presentes, son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁-C₁₀ o alqueno C₂-C₁₀ opcionalmente sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

En algunas realizaciones, R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄ opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R¹ y R² son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, R⁴ y R⁵ son ambos grupos butilo. En otra realización preferida más, n es 1. En otras realizaciones, R³ está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R³ es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R³ es un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R⁴ y R⁵ son independientemente un alquilo C₂-C₆ o C₂-C₄ o un alqueno C₂-C₆ o C₂-C₄ opcionalmente sustituido.

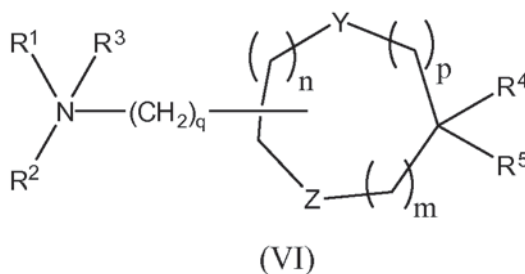
En una realización alternativa, el lípido catiónico de fórmula V comprende enlaces éster entre el grupo cabeza de amino y una o ambas de las cadenas de alquilo. En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula V forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula V es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

Aunque cada una de las cadenas de alquilo en la fórmula V contiene dobles enlaces *cis* en las posiciones 6, 9, y 12 (es decir, *cis,cis,cis*-Δ⁶, Δ⁹, Δ¹²), en una realización alternativa, uno, dos, o tres de estos dobles enlaces en una o ambas cadenas de alquilo pueden estar en la configuración *trans*.

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula V tiene la estructura:



En otro aspecto, los lípidos catiónicos de fórmula VI que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



o sales de los mismos, en la que: R¹ y R² son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁-C₆, alqueno C₂-C₆ o alquino C₂-C₆ opcionalmente sustituido, o R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R³ está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₄, alqueno C₁₂-C₂₄, alquino C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido, en la que al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende al menos tres sitios de insaturación o un alquilo C₁₂-C₂₄ sustituido; m, n, y p son iguales o diferentes y son independientemente cualquiera de 0, 1, o 2, con la salvedad de que m, n, y p no son simultáneamente 0; q es 0, 1, 2, 3, o 4; e Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente O, S, o NH.

En algunas realizaciones, R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄ opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R¹ y R² son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, q es 2. En otras realizaciones, R³ está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R³ es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R³ es un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R⁴ y R⁵ son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂, un alqueno C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂, un alquino C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ o un acilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ opcionalmente sustituido.

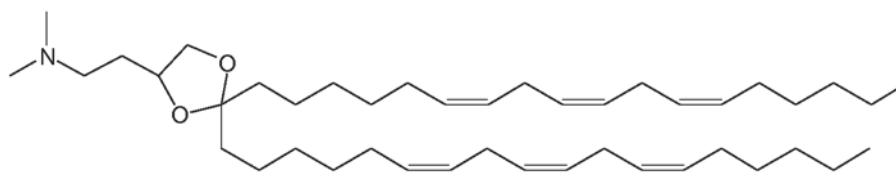
5 En las realizaciones donde al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende un grupo alquilo ramificado (por ejemplo, un grupo alquilo C₁₂-C₂₄ sustituido), el grupo alquilo ramificado puede comprender un alquilo C₁₂-C₂₄ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C₁-C₆. En realizaciones particulares, el grupo alquilo ramificado comprende un alquilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Preferentemente, el grupo alquilo ramificado comprende un resto fitanilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanilo). En otras realizaciones preferidas, R⁴ y R⁵ son ambos restos fitanilo.

10 En realizaciones alternativas, al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende un grupo acilo ramificado (por ejemplo, un grupo acilo C₁₂-C₂₄ sustituido). En determinados casos, el grupo acilo ramificado puede comprender un acilo C₁₂-C₂₄ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C₁-C₆. En realizaciones particulares, el grupo acilo ramificado comprende un acilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Preferentemente, el grupo acilo ramificado comprende un resto de fitanoilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoilo).

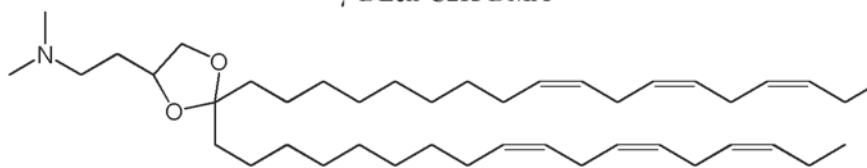
15 En realizaciones en donde al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende al menos tres sitios de insaturación, los dobles enlaces presentes en una o ambas cadenas de alquilo pueden encontrarse en la configuración *cis* y/o *trans*. En algunas realizaciones, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, y un resto de fitanilo, así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, γ -linoleoilo, fitanoilo, etc.). En determinados casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones preferidas, R⁴ y R⁵ son ambos restos de linolenilo o restos de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R⁴ y R⁵ comprenden independientemente una cadena principal de aproximadamente 16 a aproximadamente 22 átomos de carbono, y uno o ambos de R⁴ y R⁵ comprenden independientemente al menos tres, cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación.

25 En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula VI forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula VI es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

30 En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula VI tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:

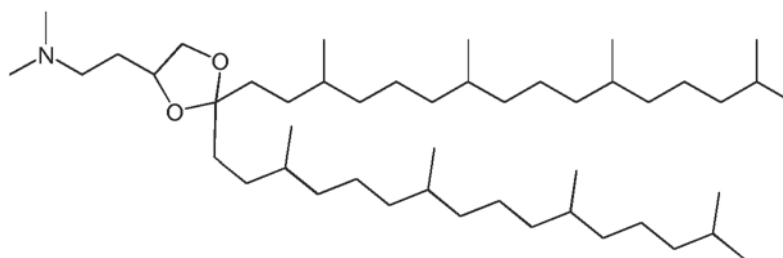


γ -DLen-C2K-DMA



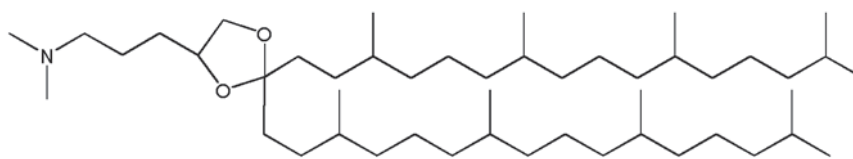
DLen-C2K-DMA

35



DPan-C2K-DMA

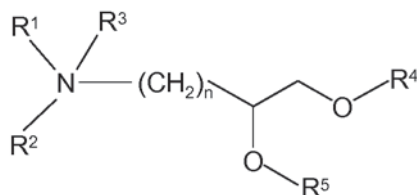
y



DPan-C3K-DMA

En otro aspecto más, los lípidos catiónicos de fórmula VII que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:

5



(VII)

o sales de los mismos, en la que: R¹ y R² están unidos para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R³ está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₄, alqueniilo C₁₂-C₂₄, alquinilo C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

10

En algunas realizaciones, R¹ y R² se unen para formar un anillo heterocíclico de 5 átomos de carbono y 1 átomo de nitrógeno. En determinados casos, el anillo heterocíclico está sustituido con un sustituyente, tal como un grupo hidroxilo en las posiciones orto, meta, y/o para. En una realización preferida, n es 1. En otras realizaciones, R³ está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R³ es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R³ es un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R⁴ y R₅ son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂, un alqueniilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂, un alquinilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ o un acilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ opcionalmente sustituido.

15

20

En determinadas realizaciones, R⁴ y R⁵ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de dodecadieniilo, un resto de tetradecadieniilo, un resto de hexadecadieniilo, un resto de octadecadieniilo, un resto de icosadieniilo, un resto de dodecatrieniilo, un resto de tetradecatrieniilo, un resto de hexadecatrieniilo, un resto de octadecatrieniilo, un resto de icosatrieniilo, y un grupo alquilo ramificado, tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un resto de fitaniilo), así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenoilo, γ-linolenoilo, fitanoilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadieniilo es un resto de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrieniilo es un resto de linolenilo o un resto de γ-linolenilo. En realizaciones particulares, R⁴ y R⁵ son ambos restos de linoleilo, restos de linolenilo, restos de γ-linolenilo, o restos de fitaniilo.

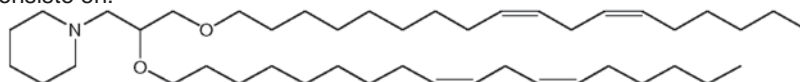
25

30

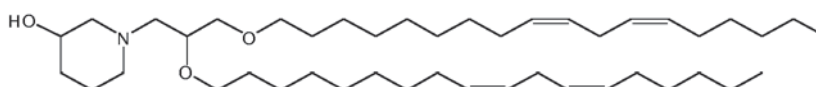
En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula VII forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula VII es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

35

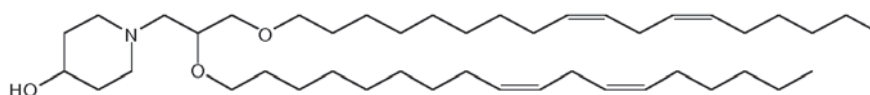
En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula VII tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



DLinPip,

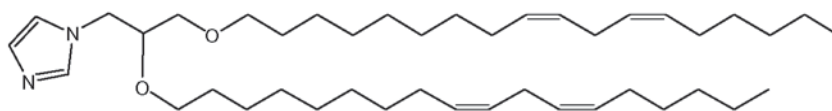


DLinPip (3-OH),



DLinPip (4-OH), and

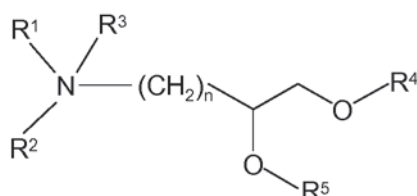
40



DLinIm

En otro aspecto más, los lípidos catiónicos de fórmula VIII que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:

5



(VIII)

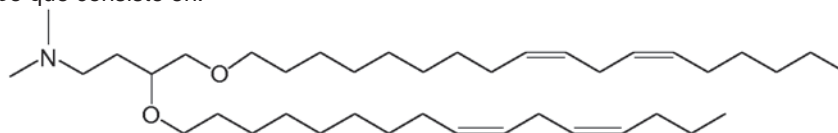
o sales de los mismos, en la que: R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alqueniilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido; y n es 2, 3, o 4.

15 En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alqueniilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, n es 2. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R^4 y R^5 son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alqueniilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.

25 En determinadas realizaciones, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de dodecadieniilo, un resto de tetradecadieniilo, un resto de hexadecadieniilo, un resto de octadecadieniilo, un resto de icosadieniilo, un resto de dodecatrieniilo, un resto de tetradecatrieniilo, un resto de hexadecatrieniilo, un resto de octadecatrieniilo, un resto de icosatrieniilo, y un grupo alquilo ramificado, tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un resto de fitaniilo), así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenilo, γ -linolenilo, fitanoilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadieniilo es un resto de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrieniilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R^4 y R^5 son ambos restos de linoleilo, restos de linolenilo, restos de γ -linolenilo, o restos de fitaniilo.

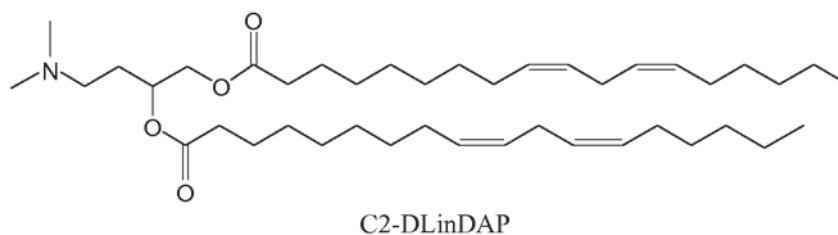
35 En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula VIII forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula VIII es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula VIII tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:

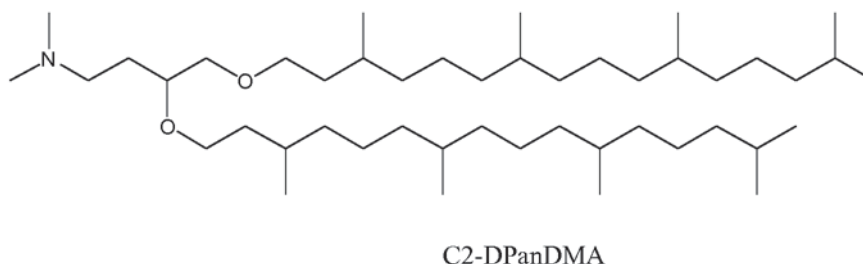


C2-DLinDMA

40

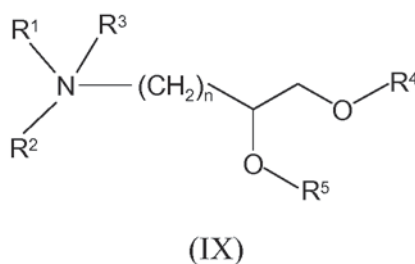


y



5

En otro aspecto, los lípidos catiónicos de fórmula IX que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



10

o sales de los mismos, en la que: R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alquenilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 son diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_{24} , alquenilo C_2-C_{24} , alquinilo C_2-C_{24} o acilo C_1-C_{24} opcionalmente sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

15

En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, n es 1. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R^4 y R^5 son diferentes y son independientemente un alquilo C_4-C_{20} , alquenilo C_4-C_{20} , alquinilo C_4-C_{20} o acilo C_4-C_{20} opcionalmente sustituido.

20

25

En algunas realizaciones, R^4 es un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alquenilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido, y R^5 es un alquilo C_4-C_{10} , alquenilo C_4-C_{10} , alquinilo C_4-C_{10} o acilo C_4-C_{10} opcionalmente sustituido. En determinados casos, R^4 es un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquenilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido, y R^5 es un alquilo C_4-C_8 o C_6 , un alquenilo C_4-C_8 o C_6 , un alquinilo C_4-C_8 o C_6 o un acilo C_4-C_8 o C_6 opcionalmente sustituido.

30

En otras realizaciones, R^4 es un alquilo C_4-C_{10} , alquenilo C_4-C_{10} , alquinilo C_4-C_{10} o acilo C_4-C_{10} opcionalmente sustituido, y R^5 es un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alquenilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido. En determinados casos, R^4 es un alquilo C_4-C_8 o C_6 , un alquenilo C_4-C_8 o C_6 , un alquinilo C_4-C_8 o C_6 o un acilo C_4-C_8 o C_6 opcionalmente sustituido, y R^5 es independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquenilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.

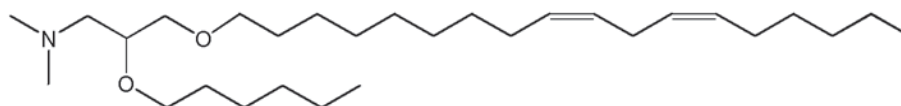
35

En realizaciones particulares, R^4 es un resto de linoleilo, y R^5 es un resto de alquilo C_6 , un resto de alquenilo C_6 , un resto de octadecilo, un resto de oleilo, un resto de linolenilo, un resto de γ -linolenilo, o un resto de fitanilo. En otras realizaciones, uno de R^4 o R^5 es un resto de fitanilo.

40

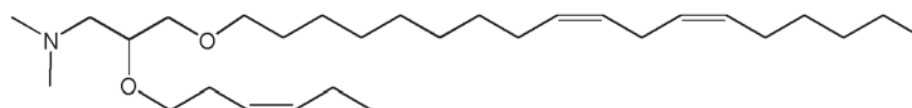
En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula IX forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula IX es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

5 En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula IX es un lípido asimétrico que tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



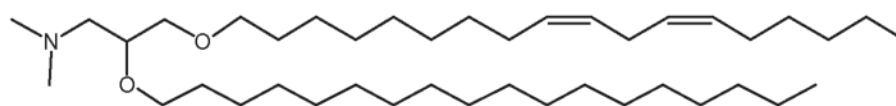
Linoleil/C₆:0 DMA

10



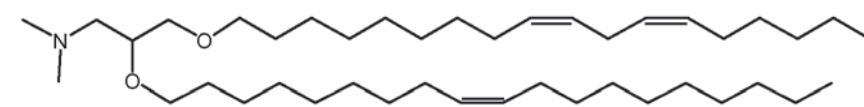
Linoleil/C₆:1 DMA

15



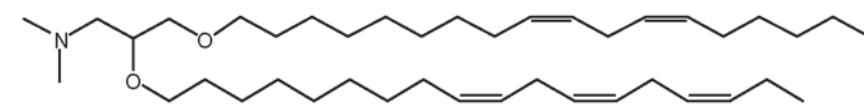
Linoleil/Estearil DMA

20



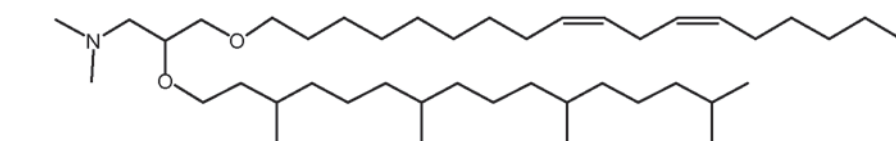
Linoleil/Oleil DMA

25



Linoleil/Linolenil DMA

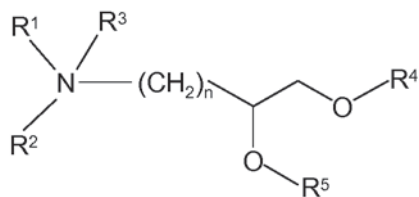
y



Linoleil/fitanil DMA

30

En otro aspecto más, los lípidos catiónicos de fórmula X que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



(X)

35

o sales de los mismos, en la que: R¹ y R² son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁-C₆, alquenilo C₂-C₆ o alquinilo C₂-C₆ opcionalmente sustituido, o R¹ y R² pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el

grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R³ está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C₁-C₆ para proporcionar una amina cuaternaria; R⁴ y R⁵ son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₄, alqueno C₁₂-C₂₄, alquino C₁₂-C₂₄ o acilo C₁₂-C₂₄ opcionalmente sustituido, en la que al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende al menos cuatro sitios de insaturación o un alquilo C₁₂-C₂₄ sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

En algunas realizaciones, R¹ y R² son independientemente un alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄ opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R¹ y R² son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, n es 1. En otras realizaciones, R³ está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R³ es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R³ es un alquilo C₁-C₄ opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R⁴ y R⁵ son independientemente un alquilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂, un alqueno C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂, un alquino C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ o un acilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ opcionalmente sustituido.

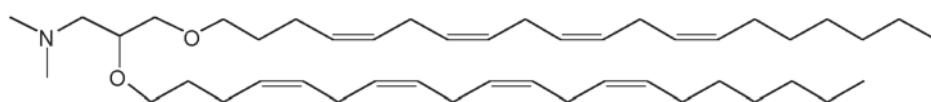
En las realizaciones donde al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende un grupo alquilo ramificado (por ejemplo, un grupo alquilo C₁₂-C₂₄ sustituido), el grupo alquilo ramificado puede comprender un alquilo C₁₂-C₂₄ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C₁-C₆. En realizaciones particulares, el grupo alquilo ramificado comprende un alquilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Preferentemente, el grupo alquilo ramificado comprende un resto fitanilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanilo).

En realizaciones alternativas, al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende un grupo acilo ramificado (por ejemplo, un grupo acilo C₁₂-C₂₄ sustituido). En determinados casos, el grupo acilo ramificado puede comprender un acilo C₁₂-C₂₄ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C₁-C₆. En realizaciones particulares, el grupo acilo ramificado comprende un acilo C₁₂-C₂₀ o C₁₄-C₂₂ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C₁-C₄ (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Preferentemente, el grupo acilo ramificado comprende un resto de fitanoilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoilo).

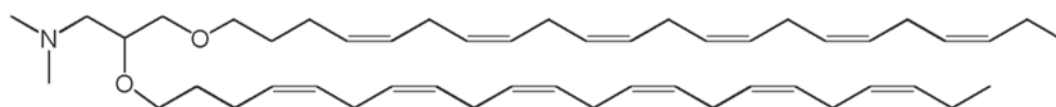
En realizaciones en donde al menos uno de R⁴ y R⁵ comprende al menos cuatro sitios de insaturación, los dobles enlaces presentes en una o ambas cadenas de alquilo pueden encontrarse en la configuración *cis* y/o *trans*. En una realización particular, R⁴ y R⁵ comprenden independientemente cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación. En algunos casos, R⁴ comprende cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación y R⁵ comprende cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación. En otros casos, R⁴ comprende cero, uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación y R⁵ comprende cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación. En una realización preferida, tanto R⁴ como R⁵ comprenden cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación. En realizaciones particulares, R⁴ y R⁵ comprenden independientemente una cadena principal de aproximadamente 18 a aproximadamente 24 átomos de carbono, y uno o ambos de R⁴ y R⁵ comprenden independientemente al menos cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula X forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula X es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula X tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:

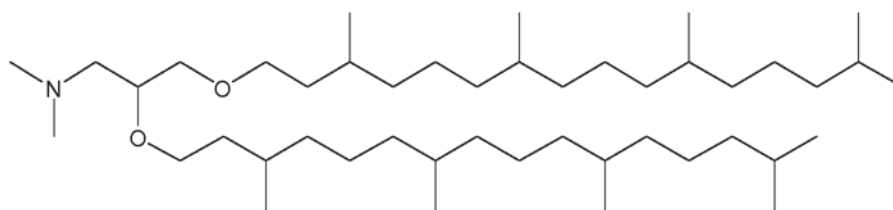


DAraDMA



DDocDMA

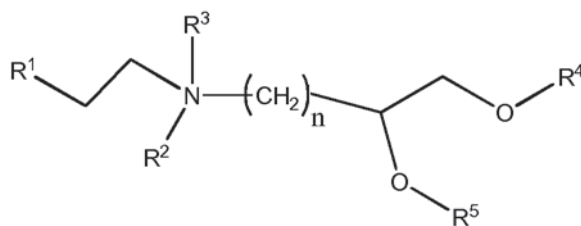
, y



DPanDMA

En otro aspecto más, los lípidos catiónicos de fórmula XI que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:

5



(IX)

o sales de los mismos, en la que: R^1 es hidrógeno (H) o $-(CH_2)_q-NR^6R^7R^8$, en la que: R^6 y R^7 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alquenilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^6 y R^7 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^8 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; y q es 0, 1, 2, 3, o 4; R^2 es un alquilo C_1-C_6 , alquenilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alquenilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

En algunas realizaciones, R^2 es un alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En determinadas realizaciones, R^4 y R^5 son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquenilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.

En realizaciones adicionales, R^6 y R^7 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En otras realizaciones, R^8 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^8 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^8 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria.

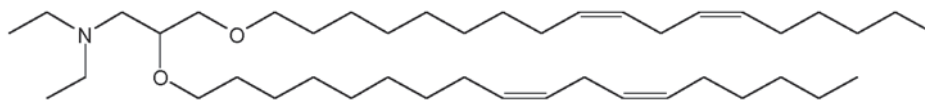
En una realización preferida, R^1 es hidrógeno y R^2 es un grupo etilo. En otra realización preferida, R^6 y R^7 son ambos grupos metilo. En determinados casos, n es 1. En otros casos determinados, q es 1.

En determinadas realizaciones, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, y un grupo alquilo ramificado, tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un resto de fitanilo), así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenilo, γ -linolenilo, fitanoilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R^4 y R^5 son ambos restos de linoleilo, restos de linolenilo, restos de γ -linolenilo, o restos de fitanilo.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula XI forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula XI es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

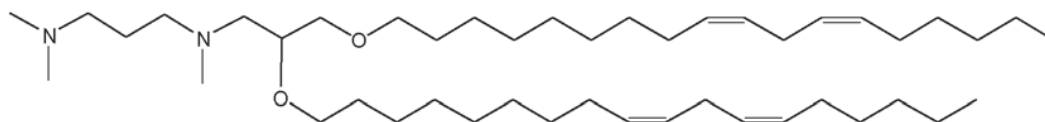
En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula XI tiene una estructura seleccionada

entre el grupo que consiste en:



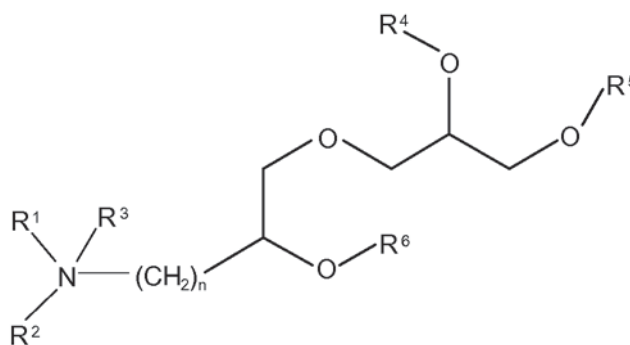
DLinDEA

5 y



2N-DLinDMA

10 En otro aspecto, los lípidos catiónicos de fórmula XII que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



(XII)

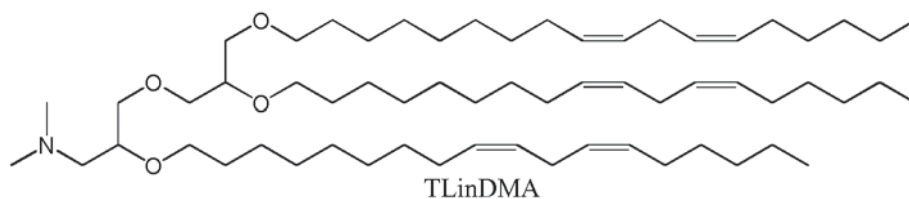
15 o sales de los mismos, en la que: R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 , R^5 , y R^6 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alqueniilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

25 En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alqueniilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, n es 1. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R^4 , R^5 , y R^6 son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alqueniilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.

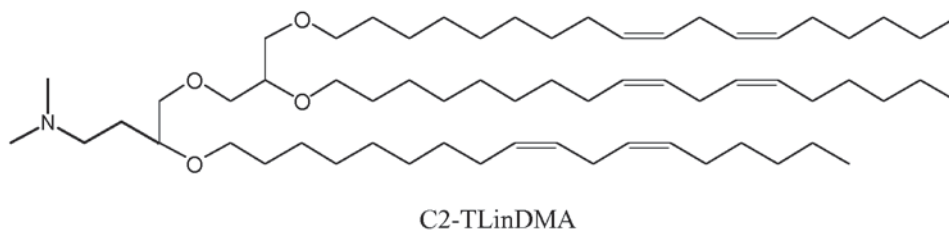
30 En determinadas realizaciones, R^4 , R^5 , y R^6 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de dodecadieniilo, un resto de tetradecadieniilo, un resto de hexadecadieniilo, un resto de octadecadieniilo, un resto de icosadieniilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrieniilo, un resto de hexadecatrieniilo, un resto de octadecatrieniilo, un resto de icosatrieniilo, y un grupo alquilo ramificado, tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un resto de fitaniilo), así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenioilo, γ -linolenioilo, fitanoilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadieniilo es un resto de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrieniilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R^4 , R^5 , y R^6 son todos restos de linoleilo, restos de linolenilo, restos de γ -linolenilo, o restos de fitaniilo.

40 En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula XII forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula XII es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

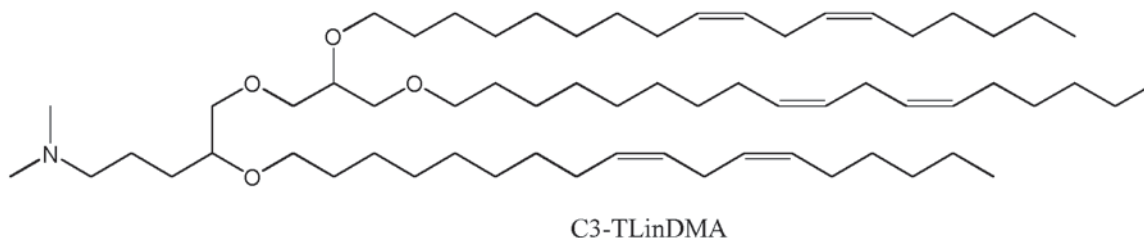
En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula XII tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



5

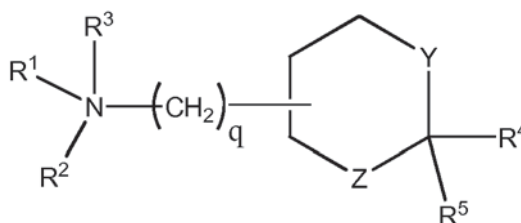


y



10

En otro aspecto más, los lípidos catiónicos de fórmula XIII que tienen la siguiente estructura son útiles en la presente invención:



(XIII)

15

o sales de los mismos, en la que: R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alquenilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alquenilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido; q es 0, 1, 2, 3, o 4; e Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente O, S, o NH, en la que si q es 1, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo, R^4 y R^5 son ambos restos de linoleilo, e Y y Z son ambos O, entonces el grupo alquilamino está unido a uno de los dos carbonos adyacentes a Y o Z (es decir, en la posición "4" o "6" del anillo de 6 miembros).

20

25

En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, q es 2. En una realización particular, Y y Z son ambos oxígeno (O). En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R^4 y R^5 son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquenilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.

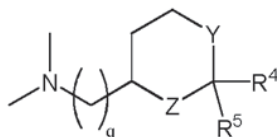
30

35

En otras realizaciones, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de

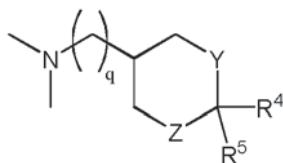
dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, y un grupo alquilo ramificado, tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un resto de fitanilo), así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleilo, linolenilo, γ -linolenilo, fitanoilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R^4 y R^5 son ambos restos de linoleilo, restos de linolenilo, restos de γ -linolenilo, o restos de fitanilo.

El grupo de cabeza de alquilamino de fórmula XIII puede estar unido a la posición "4" o "5" del anillo de 6 miembros tal como se muestra a continuación en una realización ejemplar en la que R^1 y R^2 son ambos grupos metilo:



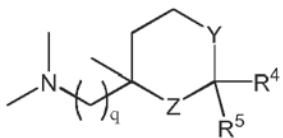
Grupo de cabeza en la posición "4"

o



Grupo de cabeza en la posición "5"

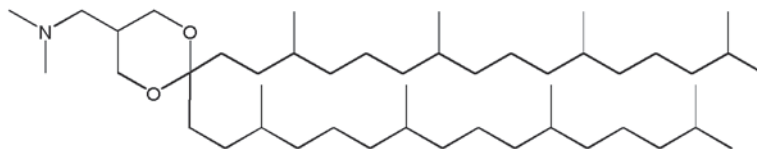
En realizaciones adicionales, el anillo de 6 miembros de fórmula XIII puede estar sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 seleccionados independientemente entre sustituyentes alquilo C_1 - C_6 , alqueno C_2 - C_6 , alquino C_2 - C_6 , alcoxi C_1 - C_6 o hidroxilo. En una realización particular, el anillo de 6 miembros está sustituido con 1, 2, 3, 4, o 5 sustituyentes alquilo C_1 - C_4 seleccionados independientemente (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Una realización ejemplar de un lípido catiónico de fórmula XIII que tiene un anillo de 6 miembros sustituido (grupo metilo unido a la posición "4") y en el que R^1 y R^2 son ambos grupos metilo se muestra a continuación:



En realizaciones particulares, los lípidos catiónicos de fórmula XIII pueden sintetizarse usando 2-hidroxi metil-1,4-butanodiol y 1,3,5-pentanotriol (o 3-metil-1,3,5-pentanotriol) como materiales de partida.

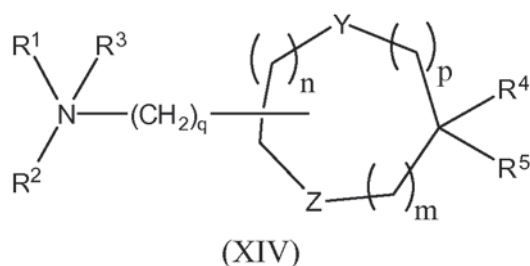
En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula XIII forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula XIII es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula XIII tiene la estructura:



DPan-C1K6-DMA

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un lípido catiónico de fórmula XIV que tiene la siguiente estructura:



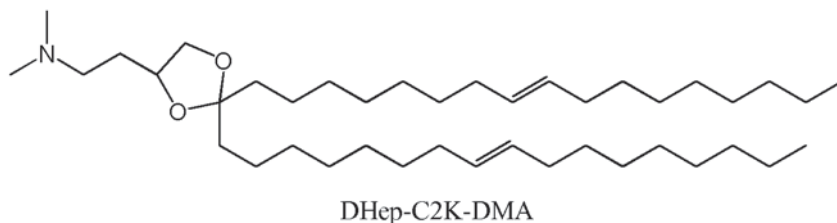
o sales del mismo, en la que: R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alqueno C_2-C_6 o alquino C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico
 5 opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alqueno $C_{12}-C_{24}$, alquino $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido, en la que al menos uno de R^4 y R^5 comprende al menos un sitio de insaturación en la configuración *trans* (*E*); m, n, y p son iguales o
 10 diferentes y son independientemente cualquiera de 0, 1, o 2, con la salvedad de que m, n, y p no son simultáneamente 0; q es 0, 1, 2, 3, o 4; e Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente O, S, o NH.

En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alqueno C_2-C_4 o alquino C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En otra realización preferida, q es 2. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R^4 y R^5 son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alqueno $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquino $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.
 15
 20

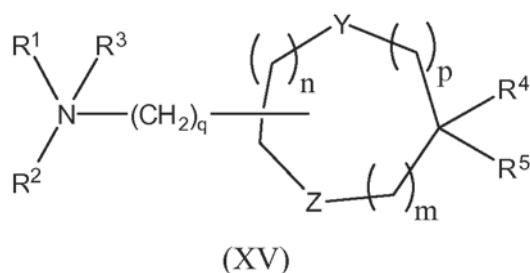
En determinadas realizaciones, al menos uno de R^4 y R^5 comprende además uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más sitios de insaturación en la configuración *cis* y/o *trans*. En algunos casos, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre cualquiera de los grupos alquilo o acilo sustituidos o sin sustituir descritos en el presente documento, en la que al menos uno o ambos de R^4 y R^5 comprende al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación en la configuración *trans*. En una realización particular, R^4 y R^5 comprenden independientemente una cadena principal de aproximadamente 12 a aproximadamente 22 átomos de carbono (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, o 22 átomos de carbono), y uno o ambos de R^4 y R^5 comprenden independientemente al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, o seis sitios de insaturación en la configuración *trans*.
 25
 30 En algunas realizaciones preferidas, al menos uno de R^4 y R^5 comprende un resto de (*E*)-heptadecilo. En otras realizaciones preferidas, R^4 y R^5 son ambos restos de (*E*)-8-heptadecilo.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula XIV forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula XIV es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.
 35

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula XIV tiene la estructura:



40 En otro aspecto, la presente invención proporciona un lípido catiónico de fórmula XV que tiene la siguiente estructura:



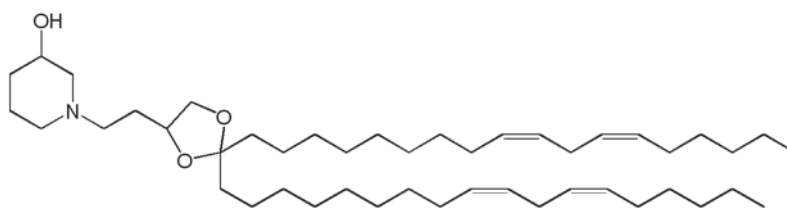
o sales de los mismos, en la que: R^1 y R^2 están unidos para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos; R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; R^4 y R^5 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$, alquenoilo $C_{12}-C_{24}$, alquinilo $C_{12}-C_{24}$ o acilo $C_{12}-C_{24}$ opcionalmente sustituido; m, n, y p son iguales o diferentes y son independientemente cualquiera de 0, 1, o 2, con la salvedad de que m, n, y p no son simultáneamente 0; q es 0, 1, 2, 3, o 4; e Y y Z son iguales o diferentes y son independientemente O, S, o NH.

En algunas realizaciones, R^1 y R^2 se unen para formar un anillo heterocíclico de 5 átomos de carbono y 1 átomo de nitrógeno. En determinados casos, el anillo heterocíclico está sustituido con un sustituyente, tal como un grupo hidroxilo en las posiciones orto, meta, y/o para. En una realización preferida, q es 2. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria. En realizaciones adicionales, R^4 y R^5 son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquenoilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$, un alquinilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ o un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ opcionalmente sustituido.

En determinadas realizaciones, R^4 y R^5 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste un resto de dodecadienilo, un resto de tetradecadienilo, un resto de hexadecadienilo, un resto de octadecadienilo, un resto de icosadienilo, un resto de dodecatrienilo, un resto de tetradecatrienilo, un resto de hexadecatrienilo, un resto de octadecatrienilo, un resto de icosatrienilo, y un grupo alquilo ramificado, tal como se ha descrito anteriormente (por ejemplo, un resto de fitanilo), así como derivados de acilo de los mismos (por ejemplo, linoleoilo, linolenilo, γ -linolenilo, fitanoilo, etc.). En algunos casos, el resto de octadecadienilo es un resto de linoleilo. En otros casos, el resto de octadecatrienilo es un resto de linolenilo o un resto de γ -linolenilo. En realizaciones particulares, R^4 y R^5 son ambos restos de linoleilo, restos de linolenilo, restos de γ -linolenilo, o restos de fitanilo.

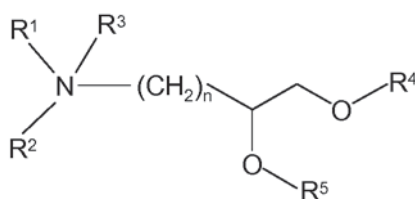
En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula XV forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula XV es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula XV tiene la estructura:



DLin-C2K-Pip-3OH

En otro aspecto más, la presente invención proporciona un lípido catiónico de fórmula XVI que tiene la siguiente estructura:



(XVI)

o sales de los mismos, en la que:

R^1 y R^2 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo C_1-C_6 , alqueniilo C_2-C_6 o alquinilo C_2-C_6 opcionalmente sustituido, o R^1 y R^2 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos seleccionados entre el grupo que consiste en nitrógeno (N), oxígeno (O), y mezclas de los mismos;

R^3 está ausente o es hidrógeno (H) o un alquilo C_1-C_6 para proporcionar una amina cuaternaria;

R^4 y R^5 son iguales o diferentes y son independientemente un alquilo $C_{12}-C_{24}$ sustituido; y n es 0, 1, 2, 3, o 4.

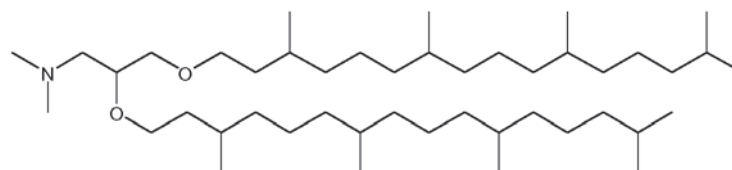
En algunas realizaciones, R^1 y R^2 son independientemente un alquilo C_1-C_4 , alqueniilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 opcionalmente sustituido. En una realización preferida, R^1 y R^2 son ambos grupos metilo. En una realización particular, n es 1. En otra realización particular, n es 2. En otras realizaciones, R^3 está ausente cuando el pH se encuentra por encima del pK_a del lípido catiónico y R^3 es hidrógeno cuando el pH se encuentra por debajo del pK_a del lípido catiónico, de tal forma que el grupo de cabeza de amino está protonado. En una realización alternativa, R^3 es un alquilo C_1-C_4 opcionalmente sustituido para proporcionar una amina cuaternaria.

En las realizaciones donde al menos uno de R^4 y R^5 comprende un grupo alquilo ramificado (por ejemplo, un grupo alquilo $C_{12}-C_{24}$ sustituido), el grupo alquilo ramificado puede comprender un alquilo $C_{12}-C_{24}$ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C_1-C_6 . En realizaciones particulares, el grupo alquilo ramificado comprende un alquilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C_1-C_4 (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Preferentemente, el grupo alquilo ramificado comprende un resto fitanilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanilo). En realizaciones particulares, R^4 y R^5 son ambos restos fitanilo.

En realizaciones alternativas, al menos uno de R^4 y R^5 comprende un grupo acilo ramificado (por ejemplo, un grupo acilo $C_{12}-C_{24}$ sustituido). En determinados casos, el grupo acilo ramificado puede comprender un acilo $C_{12}-C_{24}$ que tiene al menos 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) sustituyentes alquilo C_1-C_6 . En realizaciones particulares, el grupo acilo ramificado comprende un acilo $C_{12}-C_{20}$ o $C_{14}-C_{22}$ con 1-6 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6) sustituyentes alquilo C_1-C_4 (por ejemplo, metilo, etilo, propilo, o butilo). Preferentemente, el grupo acilo ramificado comprende un resto de fitanoilo (3,7,11,15-tetrametil-hexadecanoilo). En realizaciones particulares, R^4 y R^5 son ambos restos fitanoilo.

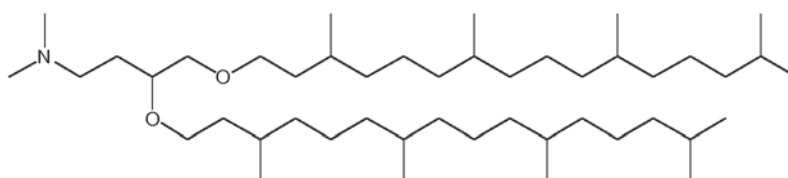
En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula XVI forma una sal (preferentemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico de fórmula XVI es la sal de oxalato (por ejemplo, hemioxalato) del mismo, que es preferentemente una sal cristalina.

En una realización particularmente preferida, el lípido catiónico de fórmula XVI tiene una estructura seleccionada entre el grupo que consiste en:



DPanDMA

y



C2-DPanDMA

La síntesis de los lípidos catiónicos de las fórmulas V-XVI se describe en el presente documento y en la Solicitud PCT n.º PCT/CA2010/___, titulada "Improved Cationic Lipids and Methods for the Delivery of Therapeutic Agents", presentada el 30 de junio de 2010, que tiene el n.º de expediente del agente 020801-009420PC.

Otros lípidos catiónicos o sales de los mismos que pueden incluirse en las partículas lipídicas descritas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, 1,2-dioleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DO-C-DAP), 1,2-

dimiristoleoil-3-dimetilamino-propano (DMDAP), cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano (DOTAP.Cl), dilinoleilmetil-3-dimetilaminopropionato (DLin-M-K-DMA; también conocido como DLin-M-DMA), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N,N-trimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethyl amonio (DM-RIE), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), dioctadecilamidoglicil espermina (DOGS), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), 1,2-dilinoleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoleiloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoleoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoleoil-2-linoleiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-dilinoleiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoleoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoleiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoleilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoleiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), y mezclas de los mismos.

Los lípidos catiónicos adicionales adecuados para su uso en combinación con uno o más lípidos catiónicos descritos en el presente documento incluyen, sin limitación, lípidos catiónicos, tales como 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (DLin-M-C3-DMA o "MC3") y determinados análogos de los mismos, tal como se describen en la Solicitud Provisional de Patente de los Estados Unidos n.º 61/334.104, titulada "Novel Cationic Lipids and Methods of Use Thereof", presentada el 12 de mayo de 2010, y las Publicaciones PCT n.º WO 2010/054401, WO 2010/054405, WO 2010/054406, y WO 2010/054384.

La síntesis de lípidos catiónicos, tales como DO-C-DAP, DMDAP, DOTAP.Cl, DLin-M-K-DMA, así como de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación PCT n.º WO 2010/042877.

La síntesis de lípidos catiónicos, tales como DLin-C-DAP, DLinDAC, DLinMA, DLinDAP, DLin-S-DMA, DLin-2-DMAP, DLinTMA.Cl, DLinTAP.Cl, DLinMPZ, DLinAP, DOAP, y DLin-EG-DMA, así como de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación PCT n.º WO 09/086558.

La síntesis de lípidos catiónicos, tales como CLinDMA, así como de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20060240554.

La síntesis de una serie de otros lípidos catiónicos y de análogos relacionados se ha descrito en las Patentes de Estados Unidos n.º 5.208.036; 5.264.618; 5.279.833; 5.283.185; 5.753.613; y 5.785.992; y la Publicación PCT n.º WO 96/10390. Además, puede usarse una serie de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, LIPOFECTIN[®] (que incluye DOTMA y DOPE, disponible a través de GIBCO/BRL); LIPOFECTAMINE[®] (que incluye DOSPA y DOPE, disponible a través de GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM[®] (que incluye DOGS, disponible a través de Promega Corp.).

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el lípido catiónico comprende de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 90 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 85 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 80 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 75 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 70 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles, de aproximadamente un 45 % en moles a aproximadamente un 55 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 90 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 85 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 80 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 75 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 70 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles, de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles, de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 65 % en moles o de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 70 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula.

En determinadas realizaciones preferidas, el lípido catiónico comprende de aproximadamente un 50 % en moles a aproximadamente un 58 % en moles, de aproximadamente un 51 % en moles a aproximadamente un 59 % en moles, de aproximadamente un 51 % en moles a aproximadamente un 58 % en moles, de aproximadamente un 51 % en moles a aproximadamente un 57 % en moles, de aproximadamente un 52 % en moles a aproximadamente un 58 % en moles, de aproximadamente un 52 % en moles a aproximadamente un 57 % en moles, de aproximadamente un 52 % en moles a aproximadamente un 56 % en moles, o de aproximadamente un 53 % en moles a aproximadamente un 55 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula.

- En otras realizaciones preferidas determinadas, el lípido catiónico comprende de aproximadamente un 54 % en moles a aproximadamente un 62 % en moles, de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 61 % en moles, de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles, de aproximadamente un 55 % en moles a aproximadamente un 59 % en moles, de aproximadamente un 56 % en moles a aproximadamente un 62 % en moles, de aproximadamente un 56 % en moles a aproximadamente un 61 % en moles, de aproximadamente un 56 % en moles a aproximadamente un 60 % en moles, o de aproximadamente un 57 % en moles a aproximadamente un 59 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula.
- En realizaciones particulares, el lípido catiónico comprende aproximadamente un 50 % en moles, 51 % en moles, 52 % en moles, 53 % en moles, 54 % en moles, 55 % en moles, 56 % en moles, 57 % en moles, 58 % en moles, 59 % en moles, 60 % en moles, 61 % en moles, 62 % en moles, 63 % en moles, 64 % en moles, o 65 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula. En otras determinadas realizaciones descritas en el presente documento, el lípido catiónico comprende (al menos) aproximadamente un 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, o 90 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula.

Debe entenderse que el porcentaje de lípido catiónico presente en las partículas lipídicas descritas en el presente documento es una cantidad objetivo, y que la cantidad real del lípido catiónico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en ± 5 % en moles. Típicamente, en la formulación de la partícula lipídica 7:54 (por ejemplo, SNALP), la cantidad objetivo de lípido catiónico es del 54,06 % en moles, pero la cantidad real de lípido catiónico puede ser ± 5 % en moles, ± 4 % en moles, ± 3 % en moles, ± 2 % en moles, ± 1 % en moles, $\pm 0,75$ % en moles, $\pm 0,5$ % en moles, $\pm 0,25$ % en moles, o $\pm 0,1$ % en moles respecto de dicha cantidad objetivo, estando formado el equilibrio de la formulación por otros componentes lipídicos (sumando hasta un 100 % en moles de los lípidos totales presentes en la partícula).

C. Lípidos no catiónicos

Los lípidos no catiónicos en las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden ser de cualquiera de una variedad de lípidos no cargados, zwitteriónicos, o aniónicos capaces de producir un complejo estable.

Los ejemplos no limitantes de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos, tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina del huevo (ESM), cefalina, cardiopina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoileoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoileiloxi-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoileoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoileoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, y mezclas de los mismos. También pueden usarse otros fosfolípidos de diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos son preferentemente grupos acilo derivados de ácidos grasos que tiene cadenas de carbono C_{10} - C_{24} , por ejemplo, lauroilo, miristoilo, palmitoilo, estearoilo, u oleoilo.

Los ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroides, tales como colesterol y derivados del mismo. Los ejemplos no limitantes de derivados de colesterol incluyen análogos polares, tales como 5α -colestanol, 5β -coprostanol, éter de colesteril-(2'-hidroxi)-etilo, éter de colesteril-(4'-hidroxi)-butilo, y 6-cetocolestanol; análogos no polares, tales como 5α -colestano, colesteno, 5α -colestano, 5β -colestano, y decanoato de colesterilo; y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el derivado de colesterol es un análogo polar, tal como éter de colesteril-(4'-hidroxi)-butilo. La síntesis del éter de colesteril-(2'-hidroxi)-etilo se describe en la Publicación PCT n.º WO 09/127060.

En algunas realizaciones, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (por ejemplo, SNALP) comprende o consiste en una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol o un derivado del mismo. En otras realizaciones, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (por ejemplo, SNALP) comprende o consiste en uno o más fosfolípidos, por ejemplo, una formulación de partículas lipídicas sin colesterol. En otras realizaciones más, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (por ejemplo, SNALP) comprende o consiste en colesterol o un derivado del mismo, por ejemplo, una formulación de partículas lipídicas sin fosfolípidos.

Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para su uso en la presente invención incluyen lípidos que no contienen fósforo, tales como, por ejemplo, estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, palmitato de acetilo, ricinoleato de glicerol, estearato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfóteros, lauril sulfato de trietanolamina, amidas de ácidos grasos polioxietilados de sulfato de alquilo-arilo, bromuro de dioctadecildimetil amonio, ceramida, esfingomielina, y similares.

- un 37 % en moles, de aproximadamente un 35 % en moles a aproximadamente un 45 % en moles, de aproximadamente un 30 % en moles a aproximadamente un 35 % en moles, de aproximadamente un 35 % en moles a aproximadamente un 40 % en moles, o aproximadamente un 30 % en moles, 31 % en moles, 32 % en moles, 33 % en moles, 34 % en moles, 35 % en moles, 36 % en moles, 37 % en moles, 38 % en moles, 39 % en moles, 40 % en moles, 41 % en moles, 42 % en moles, 43 % en moles, 44 % en moles, o 45 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una formulación de partícula lipídica 7:58 puede comprender colesterol a aproximadamente un 35 % en moles (o cualquier fracción del mismo) del lípido total presente en la partícula.
- 10 Debe entenderse que el porcentaje de lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas de la invención es una cantidad objetivo, y que la cantidad real del lípido no catiónico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en ± 5 % en moles. Por ejemplo, en la formulación de la partícula lipídica 7:54 (por ejemplo, SNALP), la cantidad objetivo de fosfolípido es del 6,75 % en moles y la cantidad objetivo de colesterol es del 32,43 % en moles, pero la cantidad real de fosfolípido puede ser ± 2 % en moles, $\pm 1,5$ % en moles, ± 1 % en moles, $\pm 0,75$ % en moles, $\pm 0,5$ % en moles, $\pm 0,25$ % en moles, o $\pm 0,1$ % en moles respecto de dicha cantidad objetivo, y la cantidad real de colesterol puede ser ± 3 % en moles, ± 2 % en moles, ± 1 % en moles, $\pm 0,75$ % en moles, $\pm 0,5$ % en moles, $\pm 0,25$ % en moles, o $\pm 0,1$ % en moles respecto de dicha cantidad objetivo, estando formado el equilibrio de la formulación por otros componentes lipídicos (sumando hasta un 100 % en moles de los lípidos totales presentes en la partícula).

20 D. Conjugados de lípido

Además de los lípidos catiónicos y no catiónicos, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden comprender además un conjugado de lípido. El conjugado de lípido es útil en tanto que previene la agregación de partículas. Los conjugados de lípidos adecuados incluyen, pero sin limitación, conjugados de PEG-lípido, conjugados de POZ-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados de polímero catiónico-lípido (CPL), y mezclas de los mismos. En determinadas realizaciones, las partículas comprenden un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido junto con un CPL.

En una realización preferida, el conjugado de lípido es un PEG-lípido. Los ejemplos de PEG-lípidos incluyen, pero sin limitación, PEG acoplado a dialquiloilpropilos (PEG-DAA) tal como se describe en, por ejemplo, la Publicación PCT n.º WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) tal como se describe en, por ejemplo, las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20030077829 y 2005008689, PEG acoplado a fosfolípidos, tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado a ceramidas tal como se describe en, por ejemplo, la patente de Estados Unidos N° 5.885.613, PEG conjugado a colesterol o un derivado del mismo, y mezclas de los mismos.

Los PEG-lípido adicionales adecuados para su uso en la invención incluyen, sin limitación, mPEG2000-1,2-di-O-alkil-*sn*3-carbamoilglicérido (PEG-C-DOMG). La síntesis de PEG-C-DOMG se describe en la Publicación PCT n.º WO 09/086558. Otros conjugados de PEG-lípido adecuados más incluyen, sin limitación, 1-[8'-(1,2-dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil- ω -metil-poli(etilenglicol) (2KPEG-DMG). La síntesis de 2KPEG-DMG se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 7.404.969.

PEG es un polímero lineal, hidrosoluble de repeticiones de etileno PEG con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 Dalton, y PEG 5000 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 Dalton. Los PEG se encuentran disponibles comercialmente a través de Sigma Chemical Co. y otras compañías e incluyen, pero sin limitación, los siguientes: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM), así como compuestos similares que contienen un grupo hidroxilo terminal en lugar de un grupo metoxi (por ejemplo, HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH₂, etc.). Otros PEG tales como aquellos descritos en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.774.180 y 7.053.150 (por ejemplo, mPEG (20 KDa) amina) también son útiles para preparar los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento. Además, el ácido monometoxipolietilenglicol-acético (MePEG-CH₂COOH) es particularmente útil para preparar los conjugados de PEG-lípido incluyendo, por ejemplo, conjugados de PEG-DAA.

El resto de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento pueden comprender un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 10.000 Dalton. En determinados casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 750 Dalton a aproximadamente 5.000 Dalton (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 5.000 Dalton, de aproximadamente 1.500 Dalton a aproximadamente 3.000 Dalton, de aproximadamente 750 Dalton a aproximadamente 3.000 Dalton, de aproximadamente 750 Dalton a aproximadamente 2.000 Dalton, etc.). En otros casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 250 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 400 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 600 Dalton a aproximadamente 900 Dalton, de aproximadamente 700 Dalton a aproximadamente 800 Dalton, o

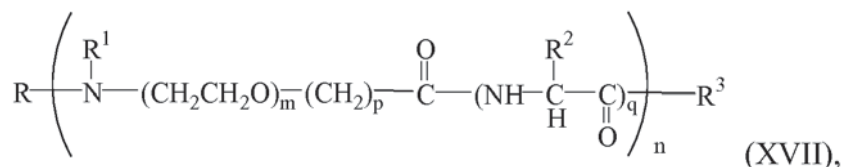
aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 Dalton. En realizaciones preferidas, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 Dalton o aproximadamente 750 Dalton.

5 En determinados casos, el PEG puede estar opcionalmente sustituido por un grupo alquilo, alcoxi, acilo, o arilo. El PEG puede conjugarse directamente al lípido o pueden unirse al lípido mediante un resto enlazador. Puede usarse cualquier resto enlazador adecuado para acoplar el PEG a un lípido, incluyendo, por ejemplo, restos enlazadores que no contienen éster y restos enlazadores que contienen éster. En una realización preferida, el resto enlazador es un resto enlazador que no contiene éster. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "resto enlazador que no contiene éster" se refiere a un resto enlazador que no contiene un enlace éster carboxílico (-OC(O)-). Los restos enlazadores adecuados que no contienen éster incluyen, pero sin limitación, amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonil (-C(O)-), carbamato (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), disulfuro (-S-S-), éter (-O-), succinil (-C(O)CH₂CH₂C(O)-), succinamidil (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), éter, disulfuro, así como combinaciones de los mismos (tales como un enlazador que contiene tanto un resto enlazador de carbamato como un resto enlazador de amido). En una realización preferida, se usa un enlazador de carbamato para acoplar el PEG al lípido.

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

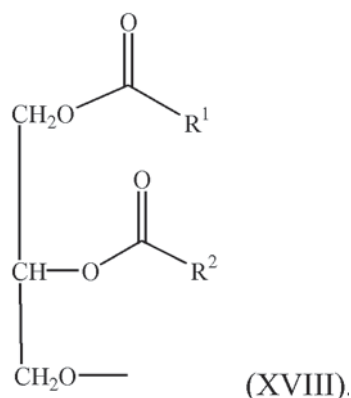
Pueden conjugarse fosfatidiletanolaminas que tienen una diversidad de grupos de cadena de acilo de diferentes longitudes de cadena y grados de acetilación al PEG para formar el conjugado de lípido. Dichas fosfatidiletanolaminas están disponibles comercialmente, o pueden aislarse o sintetizarse usando técnicas convencionales conocidas para los expertos en la materia. Se prefieren fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadena de carbono en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. También pueden usarse fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono o diinsaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, pero sin limitación, dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), y distearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE).

El término "ATTA" o "poliamida" incluye, sin limitación, los compuestos descritos en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.320.017 y 6.586.559. Estos compuestos incluyen un compuesto que tiene la fórmula:

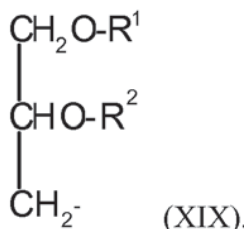


en la que R es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R¹ es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; u opcionalmente, R y R¹ y el nitrógeno al que están unidos forman un resto azido; R² es un miembro del grupo seleccionado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

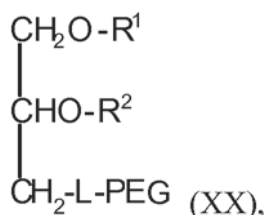
El término "diacilglicerol" o "DAG" incluye un compuesto que tiene 2 cadenas de acilo graso, R¹ y R², tienen ambos independientemente entre 2 y 30 carbonos unidos a la posición 1 y 2 del glicerol mediante enlaces éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los grupos acilo adecuados incluyen, pero sin limitación, lauroilo (C₁₂), miristoilo (C₁₄), palmitoilo (C₁₆), estearoilo (C₁₈), e icosoilo (C₂₀). En realizaciones preferidas, R¹ y R² son iguales, es decir, R¹ y R² son ambos miristoilo (es decir, dimiristoilo), R¹ y R² son ambos estearoilo (es decir, diestearoilo), etc. Los diacilgliceroles tienen la siguiente fórmula general:



El término "dialquiloxiopropilo" o "DAA" incluye un compuesto que tiene 2 cadenas de alquilo, R¹ y R², teniendo ambas independientemente entre 2 y 30 carbonos. Los grupos alquilo pueden estar saturados o tener diversos grados de insaturación. Los dialquiloxiopropilos tienen la siguiente fórmula general:



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



en la que R¹ y R² se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono; PEG es un polietilenglicol; y L es un resto enlazador que no contiene éster o un resto enlazador que contiene éster, tal como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquilo de cadena larga pueden estar saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, pero sin limitación, decilo (C₁₀), laurilo (C₁₂), miristilo (C₁₄), palmitilo (C₁₆), estearilo (C₁₈), e icosilo (C₂₀). En realizaciones preferidas, R¹ y R² son iguales, es decir, R¹ y R² son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R¹ y R² son ambos estearilo (es decir, diestearilo), etc.

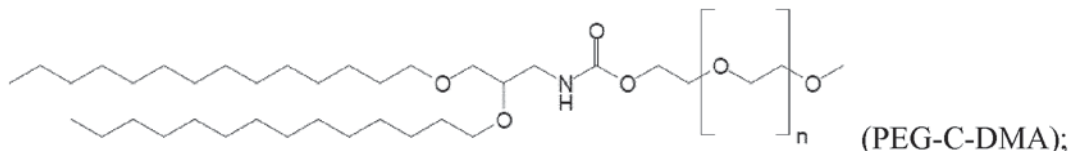
En la fórmula XX anterior, el PEG tiene un peso molecular promedio en el intervalo de aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 10.000 Dalton. En determinados casos, el PEG tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 750 Dalton a aproximadamente 5.000 Dalton (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 5.000 Dalton, de aproximadamente 1.500 Dalton a aproximadamente 3.000 Dalton, de aproximadamente 750 Dalton a aproximadamente 3.000 Dalton, de aproximadamente 750 Dalton a aproximadamente 2.000 Dalton, etc.). En otros casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de desde aproximadamente 550 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 250 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 400 Dalton a aproximadamente 1000 Dalton, de aproximadamente 600 Dalton a aproximadamente 900 Dalton, de aproximadamente 700 Dalton a aproximadamente 800 Dalton, o aproximadamente 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, o 1000 Dalton. En realizaciones preferidas, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 Dalton o aproximadamente 750 Dalton. El PEG puede estar opcionalmente sustituido por grupos alquilo, alcoxi, acilo, o arilo. En determinadas realizaciones, el grupo hidroxilo terminal está sustituido con un grupo metoxi o metilo.

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

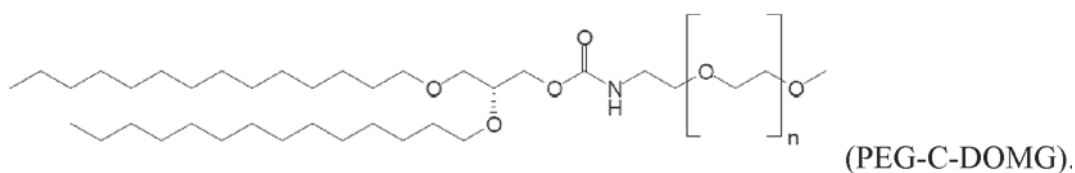
enlazador de amido (es decir, un conjugado de PEG-A-DAA). En otra realización preferida más, el resto enlazador que no contiene éster es un resto enlazador de succinamidilo (es decir, un conjugado de PEG-S-DAA).

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

5



y



10

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

15

20

Preferentemente, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de PEG-dideciloxypropilo (C₁₀), un conjugado de PEG-dilauriloxypropilo (C₁₂), un conjugado de PEG-dimiristiloxypropilo (C₁₄), un conjugado de PEG-dipalmitiloxypropilo (C₁₆), o un conjugado de PEG-diesteariloxypropilo (C₁₈). En estas realizaciones, el PEG tiene preferentemente un peso molecular promedio de aproximadamente 750 Dalton. En realizaciones particularmente preferidas, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG750-C-DMA, en el que el "750" indica el peso molecular promedio del PEG, la "C" indica un resto enlazador de carbamato, y el "DMA" indica dimiristiloxypropilo. En realizaciones particulares, el grupo hidroxilo terminal del PEG está sustituido con un grupo metilo. Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que pueden usarse otros dialquiloxypropilos en los conjugados de PEG-DAA descritos en el presente documento.

25

30

Además de lo anterior, será fácilmente evidente para los expertos en la materia que pueden usarse otros polímeros hidrófilos en lugar de PEG. Los ejemplos de polímeros adecuados que pueden usarse en lugar de PEG incluyen, pero sin limitación, polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxypropil metacrilamida, polimetacrilamida y polidimetilacrilamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y celulosas derivatizadas, tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

35

Además de los componentes anteriores, las partículas lipídicas (por ejemplo, SNALP) de la presente invención pueden comprender además lípidos catiónicos de poli(etilenglicol) (PEG) o CPL (véase, por ejemplo, Chen et al., *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); la Patente de los Estados Unidos n.º 6.852.334; la Publicación PCT n.º WO 00/62813).

40

Los CPL adecuados incluyen compuestos de fórmula XXI:

45



en la que A, W, e Y son como se describen más adelante.

En referencia a la fórmula XXI, "A" es un resto de lípido, tal como un lípido anfipático, un lípido neutro, o un lípido hidrófobo que actúa como anclaje de lípido. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, pero sin limitación, diacilgliceroles, dialquilgliceroles, N-N-dialquilaminos, 1,2-diaciloxi-3-aminopropanos, y 1,2-dialquil-3-aminopropanos.

50

"W" es un polímero o un oligómero, tal como un polímero u oligómero hidrófilo. Preferentemente, el polímero hidrófilo es un polímero biocompatible que no es inmunogénico o que posee una inmunogenicidad inherentemente baja. Como alternativa, el polímero hidrófilo puede ser débilmente antigénico en caso de que se use con los

55

adyuvantes adecuados. Los polímeros no inmunogénicos adecuados incluyen, pero sin limitación, PEG, poliamidas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 7.000 Dalton.

5 "Y" es un resto policatiónico. El término resto policatiónico se refiere a un compuesto, derivado, o grupo funcional que tiene una carga positiva, preferentemente al menos 2 cargas positivas a un pH seleccionado, preferentemente a pH fisiológico. Los restos policatiónicos adecuados incluyen aminoácidos básicos y sus derivados, tales como arginina, asparagina, glutamina, lisina, e histidina; espermina; espermidina; dendrímeros catiónicos; poliaminas; azúcares de poliaminas; y aminopolisacáridos. Los restos policatiónicos pueden ser lineales, tales como tetralisina
10 lineal, ramificados o dendrímicos en cuanto a su estructura. Los restos policatiónicos tienen entre aproximadamente 2 a aproximadamente 15 cargas positivas, preferentemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 12 cargas positivas, y más preferentemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 8 cargas positivas a valores de pH seleccionados. La selección de qué resto policatiónico se va a emplear puede determinarse según el tipo de aplicación deseada para la partícula.

Las cargas de los restos policatiónicos pueden estar distribuidas a lo largo de todo el resto de la partícula, o como alternativa, pueden ser una concentración discreta de densidad de carga en una zona particular del resto de la partícula, por ejemplo, un pico de carga. En caso de que la densidad de la carga se distribuya por toda la partícula, la densidad de carga estará distribuida de manera uniforme o de manera no uniforme. Todas las variaciones de distribución de la carga del resto policatiónico están abarcadas por la presente invención.

El lípido "A" y el polímero no inmunogénico "W" pueden estar unidos por diversos métodos y preferentemente por unión covalente. Pueden usarse métodos conocidos por los expertos en la materia para la unión covalente de "A" y "W". Los enlaces adecuados incluyen, pero sin limitación, enlaces amida, amina, carboxilo, carbonato, carbamato, éster, e hidrazona. Será evidente para los expertos en la materia que "A" y "W" tienen que tener grupos funcionales complementarios para efectuar en enlace. La reacción de estos dos grupos, uno en el lípido y el otro en el polímero, proporcionará el enlace deseado. Por ejemplo, cuando el lípido es un diacilglicerol y el hidroxilo terminal está activado, por ejemplo, con NHS y DCC, para formar un éster activo, y después se hace reaccionar con un polímero que contiene un grupo amino, tal como una poliamida (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.320.017 y 6.586.559), se formará un enlace de amida entre los dos grupos.

En determinados casos, el resto policatiónico puede tener un ligando unido, tal como un ligando de direccionamiento o un resto quelante para formar complejos con calcio. Preferentemente, después de que se haya unido el ligando, el resto catiónico mantiene una carga positiva. En determinados casos, el ligando que está unido tiene una carga positiva. Los ligandos adecuados incluyen, pero sin limitación, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluyen lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos transportadores, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos detectables analíticamente, compuestos terapéuticamente activos, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, inmunoestimuladores, radioetiquetas, fluorógenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otros restos de direccionamiento, o toxinas.

En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido) puede comprender de aproximadamente un 2 % en moles a aproximadamente un 15 % en moles, de aproximadamente un 2 % en moles a aproximadamente un 12 % en moles, de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 12 % en moles, de aproximadamente un 4 % en moles a aproximadamente un 15 % en moles, o de aproximadamente un 4 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula. En determinadas realizaciones preferidas, el conjugado lipídico (por ejemplo, PEG-lípido) comprende de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 10 % en moles, de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 9 % en moles, de aproximadamente un 5 % en moles a aproximadamente un 8 % en moles, de aproximadamente un 6 % en moles a aproximadamente un 9 % en moles, de aproximadamente un 6 % en moles a aproximadamente un 8 % en moles, o aproximadamente un 5 % en moles, 6 % en moles, 7 % en moles, 8 % en moles, 9 % en moles, o 10 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo intermedio) del lípido total presente en la partícula.

Debe entenderse que el porcentaje del conjugado de lípido (por ejemplo, PEG-lípido) presente en las partículas lipídicas de la invención es una cantidad objetivo, y que la cantidad real de conjugado de lípido presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en ± 2 % en moles. Típicamente, en la formulación de la partícula lipídica 7:54 (por ejemplo, SNALP), la cantidad objetivo del conjugado de lípido es del 6,76 % en moles, pero la cantidad real de conjugado de lípido puede ser ± 2 % en moles, $\pm 1,5$ % en moles, ± 1 % en moles, $\pm 0,75$ % en moles, $\pm 0,5$ % en moles, $\pm 0,25$ % en moles, o $\pm 0,1$ % en moles respecto de dicha cantidad objetivo, estando formado el equilibrio de la formulación por otros componentes lipídicos (sumando hasta un 100 % en moles de los lípidos totales presentes en la partícula).

65 Un experto habitual en la materia apreciará que la concentración del conjugado de lípido puede variarse dependiendo del conjugado de lípido empleado y de la velocidad a la que se desea que la partícula de lípido se

vuelva fusogénica.

Mediante el control de la composición y la concentración del conjugado de lípido, se puede controlar la velocidad a la que el conjugado de lípido intercambia la partícula y, a su vez, la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica. Por ejemplo, cuando se usa un conjugado de PEG-DAA como conjugado de lípido, puede variarse la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica, por ejemplo, variando la concentración del conjugado de lípido, variando el peso molecular del PEG, o variando la longitud de la cadena y el grado de saturación de los grupos alquilo del conjugado PEG-DAA. Además, otras variables que incluyen, por ejemplo, el pH, la temperatura, la fuerza iónica, etc. pueden usarse para variar y/o controlar la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica. Serán evidentes para los expertos en la materia otros métodos que pueden usarse para controlar la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica tras la lectura de la presente divulgación. Asimismo, mediante el control de la composición y la concentración del conjugado de lípido, se puede controlar el tamaño de la partícula lipídica (por ejemplo, SNALP).

15 V. Preparación de partículas lipídicas

Las partículas lipídicas descritas en el presente documento, por ejemplo, SNALP, en las que se atrapa un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) dentro de la porción lipídica de la partícula y se protege frente a la degradación, puede formarse mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, un método de mezclado continuo, un proceso de dilución directa, y un proceso de dilución en línea.

En realizaciones particulares, los lípidos catiónicos pueden comprender uno o más de los lípidos catiónicos descritos en el presente documento o sales de los mismos, solos o en combinación con otros lípidos catiónicos. En otras realizaciones, los lípidos no catiónicos son esfingomielina del huevo (ESM), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, 14:0 PE (1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE)), 16:0 PE (1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE)), 18:0 PE (1,2-diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE)), 18:1 PE (1,2-dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE)), 18:1 trans PE (1,2-dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE)), polímeros basados en polietilenglicol (por ejemplo, PEG 2000, PEG 5000, diacilgliceroles modificados con PEG, o dialquiloilpropilos modificados con PEG), colesterol, derivados de los mismos, o combinaciones de los mismos.

En determinadas realizaciones, en el presente documento se describen partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) producidas mediante un método de mezclado continuo, por ejemplo, un proceso que incluye proporcionar una solución acuosa que comprende un ácido nucleico (por ejemplo, ARN de interferencia) en un primer depósito, proporcionar una solución de lípido orgánico en un segundo depósito (en el que los lípidos presente en la solución de lípido orgánico se solubilizan en un disolvente orgánico, por ejemplo, un alcohol inferior, tal como etanol), y mezclar la solución acuosa con la solución de lípido orgánico, de tal forma que la solución de lípido orgánico se mezcla con la solución acuosa para producir de manera sustancialmente instantánea una vesícula lipídica (por ejemplo, liposoma) que encapsula el ácido nucleico dentro de la vesícula lipídica. Este proceso y el aparato para llevar a cabo este proceso se describen en detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20040142025.

La acción de introducir de manera continua soluciones de lípido y tampón en un ambiente de mezcla, tal como en una cámara de mezclado, provoca una dilución continua de la solución de lípido con la solución de tampón, produciendo de este modo una vesícula lipídica de manera sustancialmente instantánea después de mezclarlas. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "diluir continuamente una solución de lípido con una solución de tampón" (y sus variaciones) significa generalmente que la solución de lípido se diluye lo suficientemente rápido en un proceso de hidratación con una fuerza suficiente para efectuar la generación de las vesículas. Al mezclar la solución acuosa que comprende un ácido orgánico con la solución de lípido orgánico, la solución de lípido orgánico sufre una dilución continua por etapas en presencia de la solución de tampón (es decir, la solución acuosa) para producir una partícula de ácido nucleico-lípido.

Las partículas de ácido nucleico-lípido formadas usando el método de mezclado continuo tienen típicamente un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, menor de aproximadamente 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, o 80 nm, o de aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquier fracción del mismo o intervalo intermedio). Las partículas formadas de este modo no se agregan y opcionalmente se separan por tamaños para obtener un tamaño de partícula uniforme.

En otra realización, en el presente documento se describen partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) producidas mediante un proceso de dilución directa que incluye formar una solución de vesícula lipídica (por ejemplo, liposoma) e introducir directa e inmediatamente la solución de vesícula lipídica en un vaso de recogida que contiene una cantidad controlada de tampón de dilución. En aspectos preferidos, el vaso de recogida incluye uno o más elementos configurados para agitar los contenidos del vaso de recogida para facilitar la dilución. En un aspecto, la cantidad de tampón de dilución presente en el vaso de recogida es sustancialmente igual al volumen de solución de vesículas lipídicas introducida en el mismo. Como ejemplo no limitante, cuando se introduce una solución de vesículas lipídicas en etanol al 45% en el vaso de recogida que contiene un volumen igual de tampón de dilución, se producirán de manera ventajosa partículas más pequeñas.

En otra realización más, en el presente documento se describen partículas de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) producidas mediante un proceso de dilución en línea en el que se acopla de manera fluida un tercer depósito que contiene tampón de dilución a la segunda región de mezclado. En esta realización, la solución de vesículas lipídicas (por ejemplo, liposoma) formada en una primera región de mezclado se mezcla directa e inmediatamente con tampón de dilución en la segunda región de mezclado. En aspectos preferidos, la segunda región de mezclado incluye un conector en T dispuesto de tal modo que el caudal de solución de vesícula lipídica y el de tampón de dilución se encuentran como flujos opuestos a 180°; sin embargo, pueden usarse conectores que proporcionan ángulos menores, por ejemplo, de aproximadamente 27° a aproximadamente 180° (por ejemplo, aproximadamente 90°). Un mecanismo de bombeo proporciona un flujo controlable de tampón a la segunda región de mezclado. En un aspecto, se controla el caudal del tampón de dilución proporcionado a la segunda región de mezclado para que sea sustancialmente igual al caudal de solución de vesículas lipídicas introducidas en el mismo desde la primera región de mezclado. Esta realización permite de manera ventajosa un mayor control del caudal de mezclado de tampón de dilución con la solución de vesícula lipídica en la segunda región de mezclado, y por lo tanto, también de la concentración de solución de vesícula lipídica en el tampón a lo largo del segundo proceso de mezclado. Dicho control del caudal de dilución de tampón permite ventajosamente la formación con tamaños de partícula pequeños a concentraciones reducidas.

Estos procesos y los aparatos para llevar a cabo estos procesos de dilución directa y de dilución en línea se describen en detalle en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20070042031.

Las partículas de ácido nucleico-lípido formadas usando los procesos de dilución directa y de dilución en línea tienen típicamente un tamaño en el intervalo de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, menor de aproximadamente 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm, o 80 nm, o de aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquier fracción del mismo o intervalo intermedio). Las partículas formadas de este modo no se agregan y opcionalmente se separan por tamaños para obtener un tamaño de partícula uniforme.

En caso necesario, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden sintetizarse mediante cualquiera de los métodos disponibles para separar por tamaños los liposomas. La separación por tamaños puede llevarse a cabo para lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución de los tamaños de partícula relativamente estrecha.

Existen varias técnicas disponibles para separar por tamaños las partículas en un tamaño deseado. Un método de separación por tamaños, usado para liposomas e igualmente aplicable para las presentes partículas, se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 4.737.323. La sonicación de una suspensión de partículas mediante un baño o sonda de sonicación produce una reducción progresiva del tamaño hasta partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizalladura para fragmentar partículas mayores en otras más pequeñas. En un proceso de homogeneización típico, se recirculan las partículas a lo largo de un homogeneizador de emulsión convencional hasta que los tamaños de partícula seleccionados, típicamente de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 80 nm, se observan. En ambos métodos, puede controlarse la distribución del tamaño de partículas mediante discriminación del tamaño de partícula con haz láser convencional, o QELS.

La extrusión de las partículas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o de una membrana cerámica asimétrica es también un método eficaz para reducir los tamaños de partícula hasta una distribución de tamaño relativamente bien definida. Típicamente, la suspensión se cicla a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución de tamaño de partícula deseada. Pueden extruirse las partículas a través de membranas con poros sucesivamente menores, para lograr una reducción gradual del tamaño.

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos presentes en las partículas se precondensan tal como se describe

en, por ejemplo, la Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 09/744.103.

En otras realizaciones, los métodos pueden comprender además añadir policationes no lipídicas que son útiles para efectuar la lipofección de células usando las presentes composiciones. Los ejemplos de policationes no lipídicas adecuados incluyen, bromuro de hexadimetrina (comercializado con el nombre comercial poliBRENE[®], de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) u otras sales de hexadimetrina. Otras policationes adecuadas 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 produce preferentemente después de que se hayan formado las partículas.

En algunas realizaciones, las relaciones de ácido nucleico a lípido (relaciones en masa/masa) en una partícula de ácido nucleico-lípido formada (por ejemplo, SNALP) variará de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,2, de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 0,2, de aproximadamente 0,02 a aproximadamente 0,1, de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1, o de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08. La relación de los materiales de partida (introducidos) también se encuentra dentro de este intervalo. En otras realizaciones, la preparación de partículas usa aproximadamente 400 µg de ácido nucleico por cada 10 mg de lípido total o una relación en masa de ácido nucleico a lípido de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,08 y, más preferentemente, aproximadamente 0,04, que corresponde a 1,25 mg de lípido total por 50 µg de ácido nucleico. En otras realizaciones preferidas, la partícula tiene una relación en masa de ácido nucleico:lípido de aproximadamente 0,08.

En otras realizaciones, las relaciones de lípido a ácido nucleico (relaciones en masa/masa) en una partícula de ácido nucleico-lípido formada (por ejemplo, SNALP) variará de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 20 (20:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 15 (15:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 10 (10:1), o aproximadamente 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), o 25 (25:1), o cualquier fracción de la misma o intervalo intermedio. La relación de los materiales de partida (introducidos) también se encuentra dentro de este intervalo.

Tal como se ha descrito anteriormente, el lípido conjugado puede incluir además un CPL. En el presente documento se describen una diversidad de métodos generales para producir SNALP-CPL (SNALP que contienen CPL). Dos técnicas generales incluyen la técnica de "post-inserción", es decir, inserción de un CPL en, por ejemplo, una SNALP preformada, y la técnica "estándar", en la que el CPL se incluye en la mezcla de lípido durante, por ejemplo, las etapas de formación de la SNALP. La técnica post-infección da como resultado SNALP que tienen CPL principalmente en la cara externa de la membrana bicapa de la SNALP, mientras que la técnica estándar proporciona SNALP que tienen CPL en las caras tanto interna como externa. El método es especialmente útil para vesículas formadas a partir de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAA y PEG-DAG). Los métodos para producir las SNALP-CPL se enseñan, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.705.385; 6.586.410; 5.981.501; 6.534.484; y 6.852.334; la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20020072121; y la Publicación PCT n.º WO 00/62813.

VI. Kits

En el presente documento también se describen partículas lipídicas (por ejemplo, SNALP) en forma de kit. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que está separado en compartimentos para contener los diversos elementos de las partículas lipídicas (por ejemplo, los agentes activos o los agentes terapéuticos, tales como los ácidos nucleicos y los componentes lipídicos individuales de las partículas). Preferentemente, el kit comprende un envase (por ejemplo, un vial o una ampolla) que contiene las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP), en el que las partículas se producen mediante uno de los procesos expuestos en el presente documento. En determinadas realizaciones, el kit puede comprender además un desestabilizante de la membrana endosómica (por ejemplo, iones de calcio). El kit contiene típicamente las composiciones de partículas descritas en el presente documento, ya sea en forma de suspensión en un transportador farmacéuticamente aceptable o en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación (en caso de que estén liofilizadas) y su administración.

Tal como se explica en el presente documento, las partículas lipídicas descritas en el presente documento pueden diseñarse a medida para que se dirijan preferencialmente a tejidos, órganos, o tumores de interés particulares. Por ejemplo, tal como se expone en los ejemplos más adelante, se ha descubierto sorprendentemente que la composición de partícula lipídica 7:54 (por ejemplo, 7:54 DLinDMA SNALP) puede usarse para dirigirse

preferencialmente a tumores sólidos, tales como tumores hepáticos y tumores fuera del hígado. En realizaciones preferidas, los kits de la invención comprenden estas partículas lipídicas dirigidas a tumores (por ejemplo, 7:54 DLinDMA SNALP), en los que las partículas están presentes en un envase en forma de una suspensión o en forma deshidratada.

5 En otros casos determinados, puede ser deseable tener un resto de direccionamiento unido a la superficie de la partícula lipídica para potenciar adicionalmente el direccionamiento de la partícula. Los métodos para unir restos de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, *etc.*) a lípidos (tales como aquellos usados en las presentes partículas) son conocidos para los expertos en la materia.

10

VII. Administración de partículas lipídicas

Una vez formadas, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) son útiles para la introducción de agentes activos o agentes terapéuticos (por ejemplo, ácidos nucleicos, tal como ARN de interferencia) en células. Por consiguiente, en el presente documento se describen métodos para introducir un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARN de interferencia) en una célula. Preferentemente, la célula es una célula tumoral, tal como, por ejemplo, una célula presente en un tumor sólido. En determinadas realizaciones, la célula puede ser una célula no tumoral que produce uno o más factores angiogénicos y/o de crecimiento asociados con la tumorigénesis o la transformación celular. Los métodos se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo* formando en primer lugar las partículas tal como se han descrito en el presente documento y después poniendo en contacto las partículas con las células (por ejemplo, células de un tumor sólido) durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca el suministro del agente activo o el agente terapéutico a las células.

25 Las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden adsorberse en prácticamente cualquier tipo celular con el que se mezclan o ponen en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden endocitarse por una parte de las células, intercambiar lípidos con las membranas celulares, o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la parte de agente activo o de agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) de la partícula puede producirse a través de cualquiera de estas rutas. En particular, cuando se produce la fusión, la membrana de la partícula se integra en la membrana celular y los contenidos de la partícula se combinan con el fluido intracelular.

35 Las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden administrarse solas o en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, suero salino fisiológico o tampón fosfato) seleccionado de acuerdo con la ruta de administración y la práctica farmacéutica convencional. En general, se empleará suero salino tamponado normal (por ejemplo, NaCl 135-150 mM) como portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, suero salino al 0,4%, glicina al 0,3%, y similares, que incluyen glucoproteínas para una estabilidad aumentada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, *etc.* Se describen portadores adecuados adicionales en, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17^a ed. (1985). Tal como se usa en el presente documento, "portador" incluye cualquiera y todos 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 expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o inadecuada similar cuando se administran a un ser humano.

50 Generalmente, el portador farmacéuticamente aceptable se añade después de la formación de las partículas lipídicas. Por lo tanto, después de que la partícula lipídica (por ejemplo, SNALP) se haya formado, puede diluirse la partícula en portadores farmacéuticamente aceptables, tales como suero salino tamponado normal.

La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, formar menos de aproximadamente un 0,05%, normalmente a o al menos aproximadamente un 2 a un 5%, hasta aproximadamente un 10 a un 90% en peso, y se seleccionará principalmente según los volúmenes de fluido, las viscosidades, *etc.*, según el modo de administración particular seleccionado. Por ejemplo, puede aumentarse la concentración para reducir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada con la aterosclerosis o hipertensión grave. Como alternativa, pueden diluirse las partículas compuestas de lípidos irritantes a bajas concentraciones para reducir la inflamación en el sitio de administración.

60 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden esterilizarse mediante técnicas convencionales, de esterilización de sobra conocidas. Las soluciones acuosas pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores, agentes para el ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, y cloruro de calcio. Además, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores de

65

lípidos que protegen a los lípidos frente a los daños por radicales libres y peroxidativos de lípidos durante su almacenamiento. Los inactivadores lipófilos de radicales libres, tales como alfatocoferol, los quelantes específicos de hierro hidrosolubles, tales como ferrioxamina, son adecuados.

- 5 En algunas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) son particularmente útiles en métodos para el suministro terapéutico de uno o más ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi). En particular, en el presente documento se describen métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero (por ejemplo, un roedor, tal como un ratón o un primate, tal como un ser humano, chimpancé, o mono) regulando negativamente o silenciando la transcripción y/o traducción de una o más secuencias de ácido nucleico diana o genes de interés. Como ejemplo no limitante, los métodos descritos en el presente documento son útiles para el suministro *in vivo* de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) a un tumor u otra neoplasia de un sujeto mamífero. En determinadas realizaciones, la enfermedad o el trastorno está asociado con la expresión y/o la sobreexpresión de un gen y la expresión o la sobreexpresión del gen se reduce mediante el ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi). En otras realizaciones determinadas, puede administrarse al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula lipídica. En algunos casos, un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) se formula en una SNALP, y las partículas se administran a los pacientes que necesitan dicho tratamiento. En otros casos, se extraen células de un paciente, el ARN de interferencia se suministra *in vitro* (por ejemplo, usando una SNALP descrita en el presente documento), y se reinyectan las células al paciente.

20

A. Administración *in vivo*

La administración sistémica para terapia *in vivo*, por ejemplo, el suministro de un ácido nucleico terapéutico a una célula diana distal mediante los sistemas del organismo, tales como la circulación, se ha logrado usando partículas de ácido nucleico-lípido, tales como aquellas descritas en las Publicaciones PCT n.º WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152, y WO 04/002453. En el presente documento se describen partículas lipídicas completamente encapsuladas que protegen al ácido nucleico frente a la degradación por proteasas en el suero, no son inmunogénicas, tienen un tamaño pequeño, y son adecuadas para su dosificación repetida.

25

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

35

40

45 En las realizaciones donde las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) se administran por vía intravenosa, al menos aproximadamente un 5%, 10%, 15%, 20%, o un 25% de la dosis total inyectada de las partículas está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36, o 48 horas después de la inyección. En otras realizaciones, más de aproximadamente un 20%, 30%, 40% y tanto como hasta aproximadamente un 60%, 70% u 80% de la dosis total inyectada de las partículas lipídicas está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36, o 48 horas después de la inyección. En determinados casos, está presente más de aproximadamente un 10% de una diversidad de las partículas en el plasma de un mamífero aproximadamente 1 hora después de la administración. En otros casos determinados, la presencia de las partículas lipídicas es detectable al menos aproximadamente 1 hora después de la administración de la partícula. En determinadas realizaciones, la presencia de un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico es detectable en las células de un tumor, tal como un tumor sólido, aproximadamente a las 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras realizaciones, la regulación negativa de la expresión de una secuencia diana mediante un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) es detectable aproximadamente a las 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras realizaciones más, la regulación negativa de la expresión de una secuencia diana mediante un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) se produce preferencialmente en las células tumorales. En realizaciones adicionales, la presencia o el efecto de un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi) en las células en un sitio proximal o distal respecto del sitio de administración o en las células de un tumor es detectable aproximadamente a las 12, 24, 48, 72, o 96 horas, o aproximadamente a los 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26, o 28 días después de la administración. En realizaciones adicionales, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) se administran por vía parenteral o intraperitoneal.

50

55

60

65

Las composiciones descritas en el presente documento, ya estén solas o en combinación con otros componentes

adecuados, pueden prepararse en formulaciones de aerosol (es decir, pueden "nebulizarse") para su administración por inhalación (por ejemplo, por vía intranasal o intratraqueal) (véase, Brigham et al., Am. J. Sci., 298:278 (1989)). Las formulaciones de aerosol pueden ponerse en propelentes a presión aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

5 En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden suministrarse mediante pulverizadores intranasales, inhalación, y/u otros vehículos de administración de aerosol. Los métodos para suministrar composiciones de ácido nucleico directamente a los pulmones mediante pulverizadores de aerosol nasales se han descrito, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.756.353 y 5.804.212. Del mismo modo, el suministro intranasal de fármacos usando resinas en micropartículas y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (Patente de los Estados Unidos n.º 5.725.871) se conoce de sobra en las técnicas farmacéuticas. De forma análoga, la administración de fármacos transmucosal en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.780.045.

15 Las formulaciones adecuadas para administración parenteral, tales como, por ejemplo, por la vía intraarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, y subcutáneas, incluyen soluciones acuosas y no acuosas, isotónicas y estériles para inyección, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. En la puesta en práctica de la presente invención, las composiciones se administran preferentemente, por ejemplo, mediante infusión intravenosa, por vía oral, tópica, intraperitoneal, intravesical, o intratecal.

25 En general, cuando se administran por vía intravenosa, las formulaciones de partículas lipídicas se formulan con un portador farmacéutico adecuado. Pueden emplearse múltiples portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones y métodos descritos en el presente documento. Las formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Filadelfia, PA, 17ª ed. (1985). Puede emplearse una diversidad de portadores acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, suero salino al 0,4%, glicina al 0,3%, y similares, y pueden incluir glucoproteínas para una estabilidad aumentada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En general, se empleará suero salino tamponado normal (NaCl 135-150 mM) como portador farmacéuticamente aceptable, pero serán aceptables otros portadores adecuados. Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización de liposomas convencionales, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según sea necesario para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse usando las técnicas citadas anteriormente o, como alternativa, pueden producirse en condiciones de esterilidad. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración.

45 En determinadas aplicaciones, las partículas lipídicas divulgadas en el presente documento pueden suministrarse por administración oral al individuo. Las partículas pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, troscos, cápsulas, píldoras, pastillas para chupar, elixires, colutorios, suspensiones, pulverizadores orales, jarabes, obleas, y similares (véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.641.515, 5.580.579, y 5.792.451). Estas formas de dosificación oral también pueden contener lo siguiente: aglutinantes, gelatina; excipientes, lubricantes, y/o agentes aromatizantes. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos anteriormente, un portador líquido. Pueden estar presentes otros varios materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la dosificación unitaria. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas.

55 Típicamente, estas formulaciones orales pueden contener al menos aproximadamente un 0,1% o más de las partículas lipídicas, aunque el porcentaje de las partículas puede, por supuesto, variarse y puede ser de manera conveniente de entre aproximadamente un 1% o un 2% y aproximadamente un 60% o 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal forma que se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Los factores tales como la solubilidad, la biodisponibilidad, la semivida biológica, la vía de administración, la vida útil del producto, así como otras consideraciones farmacológicas se contemplarán por un experto en la materia de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas, y como tales, pueden ser deseables una diversidad de dosificaciones y pautas de tratamiento.

65 Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz de un agente terapéutico envasado, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARN de interferencia) suspendido en diluyentes, tales como agua, suero salino, o PEG 400; (b) cápsulas, sobrecillos, o comprimidos,

conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARN de interferencia), en forma de líquidos, sólidos, gránulos, o gelatina; (c) suspensiones en un líquido adecuado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos de calcio, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tamponadores, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, tintes, agentes disgregantes, y portadores farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARN de interferencia) en un aroma, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden el agente terapéutico en una base inerte, tales como emulsiones de gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga, geles, y similares que contienen, además del agente terapéutico, portadores conocidos en la técnica.

En otro ejemplo de su uso, las partículas lipídicas pueden incorporarse en una gran variedad de formas de dosificación. Por ejemplo, puede formularse una suspensión que contiene partículas de ácido nucleico-lípido, tal como SNALP, y administrarse en forma de geles, aceites, emulsiones, cremas tópicas, pastas, pomadas, lociones, espumas, mousses, y similares.

Cuando se elaboran las preparaciones farmacéuticas de las partículas lipídicas descritas en el presente documento, es preferible usar cantidades de las partículas que se hayan purificado para reducir o eliminar las partículas vacías o las partículas con agentes terapéuticos, tales como ácido nucleico asociado con la superficie externa.

Los métodos descritos en el presente documento pueden ponerse en práctica en una gran variedad de hospedadores. Los hospedadores preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y chimpancés, así como otros primates no humanos), cánidos, félidos, équidos, bóvidos, óvidos, cápridos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, y cerdos.

La cantidad de partículas administradas dependerá de la proporción de agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) a lípido, el agente terapéutico particular (por ejemplo, ácido nucleico) empleado, la enfermedad o trastorno que se esté tratando, la edad, el peso, y el estado del paciente, y el criterio del médico adjunto, pero generalmente será de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 10^8 - 10^{10} partículas por administración (por ejemplo, inyección).

B. Administración *in vitro*

Para aplicaciones *in vitro*, el suministro de agentes terapéuticos, tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia) puede ser a cualquier célula cultivada, ya sea de origen vegetal o animal, de vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células son células animales, más preferentemente células de mamífero, y lo más preferentemente células humanas (por ejemplo, células tumorales).

El contacto entre las células y las partículas lipídicas, cuando se lleva a cabo *in vitro*, se produce en un medio biológicamente compatible. La concentración de partículas varía ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero es generalmente de entre aproximadamente 1 μmol y aproximadamente 10 mmol. El tratamiento de las células con las partículas lipídicas se lleva a cabo generalmente a temperaturas fisiológicas (aproximadamente 37°C) durante periodos de tiempo de aproximadamente 1 a 48 horas, preferentemente de aproximadamente 2 a 4 horas.

En un grupo de realizaciones preferidas, se añade una suspensión de partículas lipídicas a células emplacadas confluentes al 60-80% que tienen una densidad celular de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^5 células/ml, más preferentemente aproximadamente 2×10^4 células/ml. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferentemente de aproximadamente 0,01 a 0,2 $\mu\text{g/ml}$, más preferentemente de aproximadamente 0,1 $\mu\text{g/ml}$.

Se conoce bien en la técnica el grado hasta el que puede ser necesario el cultivo tisular de células. Por ejemplo, Freshney, Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique, 3ª Ed., Wiley-Liss, Nueva York (1994), Kuchler et al., Biochemical Methods in Cell Culture and Virology, Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. (1977), y las referencias citadas en los mismos proporcionan una guía general para el cultivo de células. Los sistemas celulares cultivados serán generalmente en forma de monocapas de células, aunque también se usan suspensiones celulares.

Usando un ensayo de Parámetro de Liberación Endosómica (ERP), puede optimizarse la eficacia de suministro de la SNALP u otra partícula lipídica de la invención. Se describe en detalle un ensayo ERP en la Publicación de Patente de los Estados Unidos n.º 20030077829. Más particularmente, el fin de un ensayo ERP es distinguir el efecto de diversos lípidos catiónicos y de componentes lipídicos auxiliares de las SNALP u otras partículas lipídicas basándose en su efecto relativo o unión/captación o fusión con/desestabilización de la membrana endosómica. Este ensayo permite determinar de manera cuantitativa de qué modo afecta cada componente de la SNALP u otra partícula lipídica a la eficacia de suministro, optimizando de este modo la SNALP u otra partícula lipídica. Normalmente, un ensayo ERP mide la expresión de una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa, β -

galactosidasa, proteína fluorescente verde (GFP), etc.), y en algunos casos, también será adecuada una formulación de SNALP optimizada para un plásmido de expresión para encapsular un ARN de interferencia. En otros casos, puede adaptarse un ensayo ERP para medir la regulación negativa de la transcripción o traducción de una secuencia diana en presencia o ausencia de un ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi). Al comparar los

5 ERP para cada una de las diversas SNALP u otras partículas lipídicas, se puede determinar fácilmente el sistema optimizado, por ejemplo, la SNALP u otra partícula lipídica que tenga la mayor captación por parte de la célula.

C. Células para el suministro de partículas lipídicas

10 Las composiciones y métodos descritos en el presente documento se usan para tratar a una gran variedad de tipos celulares, *in vivo* e *in vitro*. En realizaciones preferidas, un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia) se suministra preferencialmente a células cancerosas (por ejemplo, células de un tumor sólido) incluyendo, pero sin limitación, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de cáncer rectal, células de cáncer anal, células de cáncer del conducto biliar, células de cáncer del intestino delgado, células de cáncer de estómago (gástrico), células de cáncer de esófago, células de cáncer de vesícula biliar, células de cáncer pancreático, células de cáncer de apéndice, células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario, células de cáncer de cuello de útero, células de cáncer de próstata, células de cáncer renal, células cancerosas del sistema nervioso central, células tumorales de glioblastoma, células de cáncer de piel, células de linfoma, células tumorales de coriocarcinoma, células de cáncer de cabeza y cuello, células tumorales de sarcoma osteogénico, y células de cáncer hematológico.

15 En otras realizaciones, un agente activo o un agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia) se suministra a hepatocitos, células precursoras (madre) hematopoyéticas, fibroblastos, queratinocitos, células endoteliales, células musculares esqueléticas y lisas, osteoblastos, neuronas, linfocitos quiescentes, células diferenciadas terminalmente, células primarias lentas o no ciclantes, células parenquimales, células linfoides, células epiteliales, células óseas, y similares.

20 El suministro *in vivo* de partículas lipídicas, tales como SNALP que encapsulan a un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN de interferencia) es adecuado para dirigirse a células tumorales de cualquier tipo celular. Los métodos y composiciones pueden emplearse con células tumorales de una gran variedad de vertebrados, incluyendo mamíferos, tales como, *por ejemplo*, cánidos, félidos, équidos, bóvidos, óvidos, cápridos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas, y cobayas), lagomorfos, cerdos, y primates (por ejemplo, monos, chimpancés, y seres humanos).

D. Detección de las partículas lipídicas

35 En algunas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) son detectables en el sujeto aproximadamente a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas. En otras realizaciones, las partículas lipídicas de la presente invención (por ejemplo, SNALP) son detectables en el sujeto aproximadamente a las 8, 12, 24, 48, 60, 72, o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, o 28 días después de la administración de las partículas. La presencia de las partículas puede detectarse en las células, tejidos, u otras muestras biológicas del sujeto. Las partículas pueden detectarse, por ejemplo, mediante detección directa de las partículas, detección de un ácido nucleico terapéutico, tal como una secuencia de ARN de interferencia (por ejemplo, ARNpi), 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 las partículas

45 Las partículas lipídicas de la invención, tales como SNALP, pueden detectarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, puede acoplarse una etiqueta directa o indirectamente a un componente de la partícula lipídica usando métodos de sobra conocidos en la técnica. Pueden emplearse una gran variedad de etiquetas, su selección dependiendo de la sensibilidad necesaria, de la facilidad de conjugación con el componente lipídico de la partícula, de los requisitos de estabilidad, y de los instrumentos disponibles y las provisiones de desechado. Las etiquetas adecuadas incluyen, pero sin limitación, etiquetas espectrales, tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Oregon Green™; rodamina y sus derivados, tales como Texas red, isotiocianato de tetrarrodimina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™, y similares; radioetiquetas, tales como ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, ³²P, ³³P, etc.; enzimas, tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.; etiquetas colorimétricas espectrales, tales como oro coloidal o perlas de vidrio o plástico coloreadas, tal como de poliestireno, polipropileno, látex, etc. La etiqueta puede detectarse usando cualquier medio conocido en la técnica.

2. Detección de los ácidos nucleicos

60 Los ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN de interferencia) se detectan y cuantifican en el presente documento mediante cualquiera de una serie de medios de sobra conocidos por los expertos en la materia. La detección de ácidos nucleicos puede efectuarse mediante métodos de sobra conocidos, tales como análisis de Southern, análisis de Northern, electroforesis en gel, PCR, radioetiquetado, conteo de centelleo, y cromatografía de afinidad. Los

métodos bioquímicos analíticos adicionales, tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC), y cromatografía de hiperdifusión, también pueden emplearse.

- 5 La selección de un formato de hibridación de ácido nucleico no es crítica. Los expertos en la materia conocen una diversidad de formatos de hibridación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los formatos comunes incluyen ensayos en sándwich y ensayos de competición o desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen de manera general en, por ejemplo, "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach", Eds. Hames y Higgins, IRL Press (1985).
- 10 Puede mejorarse la sensibilidad de los ensayos de hibridación mediante el uso de un sistema de amplificación de ácido nucleico que multiplica el ácido nucleico diana que se esté detectando. Se conocen técnicas de amplificación *in vitro* adecuadas para amplificar secuencias para su uso como sondas moleculares o para generar fragmentos de ácido nucleico para su posterior subclonación. Los ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos en la materia en dichos métodos de amplificación *in vitro*, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la
- 15 reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación de Q β -replicasa, y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA™) se encuentran en Sambrook et al., en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); y Ausubel et al., SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. y John Wiley & Sons, Inc. (2002); así como en la Patente de Estados Unidos n.º 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds.)
- 20 Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim y Levinson (1 de octubre de 1990), C&EN 36; The Journal Of NIH Research, 3:81 (1991); Kwoh et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli et al., Pro. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826 (1989); Landegren et al., Science, 241:1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291 (1990); Wu y Wallace, Gene, 4:560 (1989); Barringer et al., Gene, 89:117 (1990); y Sooknanan y Malek, Biotechnology, 13:563 (1995). Los métodos mejorados para clonar ácidos nucleicos
- 25 amplificados *in vitro* se describen en la Patente de los Estados Unidos n.º 5.426.039. Otros métodos descritos en la técnica son la amplificación basada en secuencia de ácido nucleico (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y los sistemas de Q β -replicasa. Estos sistemas pueden usarse para identificar de manera directa mutantes donde los cebadores para la PCR o LCR se diseñan para que se extiendan o ligen únicamente cuando está presente un gen seleccionado. Como alternativa, las secuencias seleccionadas pueden amplificarse generalmente usando, por
- 30 ejemplo, cebadores para la PCR no específicos y la región diana amplificada sondada posteriormente respecto de una secuencia específica indicativa de una mutación.

Los ácidos nucleicos para su uso como sondas, por ejemplo, en métodos de amplificación *in vitro*, para su uso como sondas génicas, o como componentes inhibidores, se sintetizan típicamente de manera química según el

35 método de triéster de fosoramidita de fase sólida descrito por Beaucage et al., Tetrahedron Letts., 22:1859 1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, tal como se describe en Needham VanDevanter et al., Nucleic Acids Res., 12:6159 (1984). La purificación de polinucleótidos, en los casos necesarios, se lleva a cabo normalmente mediante electroforesis nativa en gel de acrilamida o mediante HPLC de intercambio aniónico, tal como se describe en Pearson et al., J. Chrom., 255:137 149 (1983). Puede verificarse la secuencia de los

40 polinucleótidos sintéticos usando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman y Moldave (eds.) Academic Press, Nueva York, Methods in Enzymology, 65:499.

Un medio alternativo para determinar el nivel de transcripción es la hibridación *in situ*. Los ensayos de hibridación *in situ* son de sobra conocidos y se describen generalmente en Angerer et al., Methods Enzymol., 152:649 (1987). En

45 un ensayo de hibridación *in situ*, las células se fijan sobre un soporte sólido, típicamente un portaobjetos de vidrio. En caso de que se vaya a sondear el ADN, las células se desnaturalizan con calor o álcalis. Entonces se ponen en contacto las células con una solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de sondas específicas que están etiquetadas. Las sondas se etiquetan preferencialmente con radioisótopos o indicadores fluorescentes.

50

VIII. Ejemplos

La presente invención se describirá en más detalle mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención de modo alguno. Los expertos en la materia

55 reconocerán fácilmente una diversidad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para proporcionar esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

60 **ARNpi:** Todas las moléculas de ARNpi usadas en estos estudios se sintetizaron químicamente y se hibridaron usando procedimientos convencionales.

Encapsulación en lípidos del ARNpi: En algunas realizaciones, los ARNpi se encapsularon en partículas estables de ácido nucleico-lípido (SNALP) compuestas por los siguientes lípidos: (1) el conjugado de lípido PEG750-C-DMA (3-N-[-(Metoxipoli(etilenglicol)750)carbamoil]-1,2-dimiristiloxipropilamina); (2) el lípido catiónico DLinDMA (1,2-Dilinoleiloxi-3-(N,N-dimetil)aminopropano) o DLin-K-C2-DMA (2,2-dilinoleil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano;

65

“C2K”); (3) el fosfolípido DPPC (1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina; Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL); y (4) colesterol sintético (Sigma-Aldrich Corp.; St. Louis, MO) a una relación molar de 6,76:54,06:6,75:32,43, respectivamente. En otras palabras, los ARNpi se encapsularon en SNALP de la siguiente formulación "7:54": 6,76 % en moles de PEG750-C-DMA; 54,06 % en moles de DLinDMA o C2K; 6,75 % en moles de DPPC; y 32,43 % en moles de colesterol.

En otras realizaciones, los ARNpi se encapsularon en SNALP compuestas de los siguientes lípidos: (1) el conjugado de lípido PEG2000-C-DMA (3-N-[-(Metoxipoli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristiloxipropilamina); (2) el lípido catiónico DLinDMA o C2K; (3) el fosfolípido DPPC; y (4) colesterol sintético a una relación molar de 1,4:57,1:7,1:34,3, respectivamente. En otras palabras, los ARNpi se encapsularon en SNALP de la siguiente formulación "1:57": 1,4 % en moles de PEG2000-C-DMA; 57,1 % en moles de DLinDMA o C2K; 7,1 % en moles de DPPC; y 34,3 % en moles de colesterol.

Debe entenderse que la formulación 7:54 y la formulación 1:57 son formulaciones objetivo, y que la cantidad de lípido (tanto catiónico como no catiónico) presente y la cantidad de conjugado de lípido presente en la formulación pueden variar. Típicamente, en la formulación 7:54, la cantidad de lípido catiónico será de un 54,06 % en moles \pm 5 % en moles, y la cantidad de conjugado de lípido será del 6,76 % en moles \pm 1 % en moles, formándose el equilibrio de la formulación 7:54 por lípido no catiónico (por ejemplo, fosfolípido, colesterol, o una mezcla de los dos). En la formulación 1:57, la cantidad de lípido catiónico será típicamente del 57,1 % en moles \pm 5 % en moles, y la cantidad del conjugado de lípido será del 1,4 % en moles \pm 0.5 % en moles, formándose el equilibrio de la formulación 1:57 por lípido no catiónico (por ejemplo, fosfolípido, colesterol, o una mezcla de los dos).

Para los controles de vehículo, pueden formarse partículas vacías con una composición de lípidos idéntica en ausencia de ARNpi.

Ejemplo 2. Caracterización del efecto del efecto de la longitud de la cadena de alquilo del PEG-lípido y la longitud del polímero de PEG en la eficacia de encapsulación.

Los conjugados de PEG-lípido se titularon en soluciones que contenían dosis fijas de DLinDMA y colesterol. Se produjo una formulación de SNALP que contenía una molécula de ARNpi que se dirige a luciferasa (Luc) mezclando el ácido nucleico y las soluciones de lípido usando un método de prensa por jeringuilla (a una escala de 0,2 mg) con un conector en T de 1 mm y dilución directa en PBS.

La figura 1 muestra que se lograron mejores eficacias de encapsulación de la carga de ARNpi cuando se usó un mayor % en moles de un conjugado PEG750-lípido, tal como PEG750-C-DMA o PEG750-C-DSA en la formulación de SNALP. En particular, ambos conjugados de PEG750-lípido mantuvieron elevadas eficacias de encapsulamiento del ARNpi (aproximadamente un 90% o más) a un 7 % en moles de PEG-lípido, mientras que los conjugados de PEG2000-lípido mostraron únicamente aproximadamente un 40% de eficacia de encapsulación al mayor % en moles de PEG-lípido.

Ejemplo 3. Caracterización de la formulación 7:54 DLinDMA SNALP.

Se preparó una formulación 7:54 DLinDMA SNALP con un ARNpi que se dirige a la cinasa 1 similar a polo (PLK-1) (n.º de referencia de GenBank NM_005030) como componente de ácido nucleico. La secuencia de ARNpi para PLK-1 usada en este estudio se proporciona en la tabla 3.

Tabla 3

ARNpi	Secuencia de ARNpi para PLK-1	% de modificación de 2'OMe	% modificación en región BC
PLK1424 2/6	5'-AGA <u>U</u> CACCC <u>U</u> CCU <u>U</u> AAA <u>U</u> AU-3' (SEQ ID NO:1) 3'- CUUC <u>U</u> AGUGGGAGGAUUUU-5' (SEQ ID NO:2)	9/42 = 21,4%	7/38 = 18,4%

Columna 1: El número después de “PLK” se refiere a la posición de nucleótido de la base 5’ de la hebra codificante en relación al codón de inicio (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 NM_005030. Columna 2: Los nucleótidos de 2’OMe se indican en negrita y subrayado. Los salientes 3’ en una o ambas hebras de la molécula de ARNpi pueden comprender, como alternativa, 1-4 nucleótidos de desoxitimidina (dT), 1-4 ribonucleótidos modificados o no modificados de uridina (U), y 1-2 ribonucleótidos adicionales que tienen complementariedad para la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. Columna 3: Se proporciona el número y el porcentaje de nucleótidos modificados con 2’OMe en la molécula de ARNpi. Columna 4: Se proporciona el número y el porcentaje de nucleótidos modificados en la región bicatenaria (BC) de la molécula de ARNpi.

La tabla 4 muestra las relaciones molares y las características físicas de un lote representativo de la formulación 7:54 DLinDMA SNALP. La relación de masa introducida de lípido:ácido nucleico para la formulación 7:54 DLinDMA SNALP fue de aproximadamente 6.5:1 (mg totales de lípido:mg de ARNpi), que produjo un producto final de SNALP

típico que tenía una relación de masa de lípido:ácido nucleico de aproximadamente 7:1 a aproximadamente 7,5:1.

Tabla 4

Descripción	Composición (% en moles)			Producto finalizado SNALP			
	PEG750-C-DMA	DLinDMA	Chol	DPPC	Zmed (nm)	poli	Encaps (%)
7:54	6,76	54,06	32,43	6,75	79,01	0,075	93

“Zmed” = mediana de diámetro de la partícula; “poli” = polidispersidad; “Encaps” = eficacia de encapsulación.

5 La figura 2 muestra una comparación del perfil de eliminación en sangre en ratones (n = 4 cada uno) de PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP que contiene PEG750-C-DMA frente a PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP que contiene PEG2000-C-DMA. Los tiempos de circulación en sangre extendidos observados para la formulación 7:54 DLinDMA SNALP posibilitan la acumulación aumentada y la actividad de dichas partículas en sitios tumorales distales. Se usó una inyección intravenosa (IV) en bolo (2 mg/kg) de SNALP marcada con ³H en este estudio.

10 **Ejemplo 4. Actividad de la formulación 7:54 DLinDMA SNALP en hígado normal frente a tumores hepáticos.**

15 Las formulaciones 7:54 o 1:57 DLinDMA SNALP se prepararon con ARNpi para PLK-1 (Tabla 3) o ApoB como componente de ácido nucleico. Se administró a ratones con hígados normales suero salino tamponado con fosfato (PBS), ApoB 1:57 DLinDMA SNALP, o ApoB 7:54 DLinDMA SNALP por inyección intravenosa (IV) por la vena caudal lateral. Se administró a ratones con tumores intrahepáticos de Hep3B establecidos PBS, PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP, o PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP por inyección IV por la vena caudal lateral.

20 La figura 3 muestra que la formulación 1:57 DLinDMA SNALP fue capaz de silenciar la expresión de ApoB en tejido hepático normal y la expresión de PLK-1 en tumores hepáticos de Hep3B, mientras que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP mostró una actividad de silenciamiento potenciada en tumores hepáticos en comparación con el tejido hepático normal. Como tal, este ejemplo demuestra que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP se dirige preferencialmente a células tumorales en comparación con el hígado normal, mientras que la formulación 1:57 DLinDMA SNALP se dirige preferencialmente a células hepáticas normales en comparación con tumores sólidos.

25 Este ejemplo demuestra además que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP puede ayudar a limitar el silenciamiento de PLK-1 en hepatocitos en proliferación (por ejemplo, estado hepático enfermo). Los hepatocitos en el hígado sano típicamente no se dividen y por lo tanto no expresan PLK-1. Sin embargo, en los estados patológicos (por ejemplo, en un hígado canceroso), los hepatocitos normales son más proliferativos (ya que intentan reparar el daño) y por lo tanto expresan PLK-1. El uso de la formulación PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP evita el direccionamiento no deseado a hepatocitos normales en proliferación, limitando de este modo el silenciamiento de PLK-1 en estas células. Como resultado, se produce una reducción o supresión en la muerte de estos hepatocitos sanos, mientras que la expresión de PLK-1 se silencia de manera eficaz en las células tumorales.

35 **Ejemplo 5. Actividad de la formulación 7:54 DLinDMA SNALP en tumores fuera del hígado.**

40 Las formulaciones 7:54 o 1:57 DLinDMA SNALP se prepararon con ARNpi para PLK-1 como componente de ácido nucleico (tabla 3). Se administró a ratones con tumores subcutáneos (SC) establecidos de Hep3B PBS (control), PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP, o PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP mediante inyección IV a través de la vena caudal lateral a una dosis de 6 x 3 mg/kg de SNALP dos veces a la semana durante 3 semanas (días 17, 20, 24, 27, 31, 34). La figura 4 muestra que aunque múltiples dosis de PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP fueron eficaces para inducir la regresión de los tumores SC de Hep3B establecidos en comparación con los ratones de control, las múltiples dosis de PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP fueron más eficaces para inducir la regresión de estos tumores sólidos SC en comparación con la formulación PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP.

45 Por lo tanto, este estudio demuestra que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP muestra una potencia aumentada en los tumores SC y puede usarse para dirigirse preferencialmente a tumores fuera del hígado.

50 **Ejemplo 6. Comparación de la actividad de las formulaciones 7:54 DLinDMA y C2K SNALP en tumores hepáticos.**

55 Las formulaciones 7:54 o 1:57 SNALP que comprendían DLinDMA o DLin-K-C2-DMA (“C2K”) se prepararon con ARNpi para PLK-1 como componente de ácido nucleico (tabla 3). Se administró a ratones con tumores intrahepáticos de Hep3B establecidos PBS (“control”), PLK-1 7:54 C2K SNALP, PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP, PLK-1 1:57 C2K SNALP, o PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP por inyección IV por la vena caudal lateral. Cada formulación de SNALP se dosificó a 0,25 mg/kg o 1 mg/kg de ARNpi dependiendo del peso corporal. Se midieron los niveles de ARNm de PLK-1 en tumores hepáticos a las 24 horas después de la inyección.

60 La figura 5 muestra que la formulación 1:57 DLinDMA SNALP fue capaz de silenciar la expresión de PLK-1 en tumores hepáticos de Hep3B a una dosis de ARNpi de 1 mg/kg, mientras que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP

mostró una actividad de silenciamiento potenciada en los tumores hepáticos de Hep3B a la misma dosis. La figura 5 muestra también que las formulaciones 1:57 y 7:54 C2K SNALP mostraron actividades de silenciamiento de PLK-1 similares en tumores hepáticos de Hep3B. La figura 6 muestra que las formulaciones 7:54 DLinDMA y C2K SNALP tuvieron potencias similares en tumores hepáticos de Hep3B a dos dosis diferentes (es decir, 0,25 mg/kg y 1 mg/kg de ARNpi).

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP se dirige preferencialmente a células tumorales en comparación con la formulación 1:57. Este ejemplo también demuestra que las formulaciones 1:57 y 7:54 C2K SNALP son comparables en cuanto a su potencia con la formulación 7:54 DLinDMA SNALP para silenciar el ARNm de PLK-1 en tumores hepáticos de Hep3B.

Ejemplo 7. Comparación de la actividad de las formulaciones 7:54 DLinDMA y C2K SNALP en tumores fuera del hígado.

En una serie de experimentos, las formulaciones 7:54 o 1:57 SNALP que comprendían DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("C2K") se prepararon con ARNpi para PLK-1 como componente de ácido nucleico (tabla 3). Se administró a ratones con tumores subcutáneos de Hep3B establecidos PBS, PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP, PLK-1 1:57 C2K SNALP, o PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP por inyección IV por la vena caudal lateral. Cada formulación de SNALP se dosificó a 1 mg/kg o 3 mg/kg de ARNpi dependiendo del peso corporal. Se midieron los niveles de ARNm de PLK-1 en los tumores a las 24 horas después de la inyección.

La figura 7 muestra que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP era más potente para silenciar la expresión de PLK-1 en tumores subcutáneos de Hep3B en comparación con las formulaciones 1:57 DLinDMA y C2K SNALP a dos dosis diferentes (es decir, 1 mg/kg y 3 mg/kg de ARNpi). La potencia de la formulación 7:54 DLinDMA SNALP estaba apoyada por la histología tumoral. En particular, se observaron fuertes efectos histológicos a ambas dosis de 7:54 DLinDMA SNALP.

En otra serie de experimentos, las formulaciones 7:54 o 1:57 SNALP que comprendían DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("C2K") se prepararon con ARNpi para PLK-1 como componente de ácido nucleico (tabla 3). Se administró a ratones con tumores subcutáneos (SC) de Hep3B establecidos PBS, PLK-1 7:54 C2K SNALP, PLK-1 7:54 DLinDMA SNALP, PLK-1 1:57 C2K SNALP, o PLK-1 1:57 DLinDMA SNALP por inyección IV por la vena caudal lateral. Se dosificó cada formulación de SNALP a 3 mg/kg de ARNpi dependiendo del peso corporal en forma de una sola dosis o en 6 dosis (días 17, 20, 24, 27, 31, y 34). Para los estudios en una sola dosis, se midieron los niveles de ARNm de PLK-1 en los tumores a las 24 horas después de la inyección. Para los estudios de múltiples dosis, se midieron los volúmenes tumorales en determinados instantes durante el transcurso del estudio.

La figura 8 muestra que las formulaciones 1:57 DLinDMA SNALP, 1:57 C2K SNALP, y 7:54 C2K SNALP fueron capaces de silenciar la expresión de PLK-1 en tumores SC, mientras que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP mostró una actividad de silenciamiento potenciada en los tumores SC a la misma dosis. La figura 9 muestra una comparación de las potencias de diferentes lotes de las formulaciones 7:54 DLinDMA SNALP y 7:54 C2K SNALP en tumores SC. La figura 10 muestra que las formulaciones 1:57 DLinDMA SNALP, 1:57 C2K SNALP, y 7:54 C2K SNALP fueron capaces de reducir los volúmenes tumorales SC medios en el estudio multidosis, mientras que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP fue más eficaz para reducir los volúmenes tumorales SC medios. La eficacia antitumoral observada en el estudio multidosis se correlacionó con la actividad relativa de silenciamiento del ARNm de PLK-1.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que la formulación 7:54 DLinDMA SNALP muestra una potencia aumentada en los tumores SC y puede usarse para dirigirse preferencialmente a tumores fuera del hígado. Este ejemplo también demuestra que las formulaciones 1:57 y 7:54 C2K SNALP tuvieron potencias similares en tumores SC.

Ejemplo 8. Tolerabilidad de las formulaciones 7:54 DLinDMA y C2K SNALP.

Se evaluó la tolerabilidad de las formulaciones 7:54 DLinDMA y C2K SNALP con una sola administración IV de SNALP a 20 mg/kg en ratones. Se midieron los niveles de enzimas hepáticas a las 48 horas después de la inyección. La figura 11 muestra que ambas formulaciones 7:54 SNALP no elevaron de manera significativa los niveles de enzimas hepáticas en comparación con el control de PBS.

La tolerabilidad de la formulación 7:54 DLinDMA SNALP se evaluó adicionalmente ensayando la inducción de una respuesta de anticuerpo contra el componente de PEG-lípido de la SNALP. Se administró a ratones ICR 1:57 o 7:54 DLinDMA PLK-1 SNALP a una dosis de 2 x 3 mg/kg semanales. Se midieron los niveles de anticuerpo IgM e IgG anti-PEG-lípido en plasma mediante ELISA. La figura 12 muestra que no hubo evidencias de una inmunogenicidad significativa después de la administración de PLK-1 1:57 o 7:54 DLinDMA SNALP. Como tales, las formulaciones tanto 1:57 como 7:54 SNALP no inducen de manera significativa respuestas de anticuerpos IgM e IgG contra el componente PEG-lípido.

Ejemplo 9. Caracterización de formulaciones de SNALP dirigidas a tumores que contienen diversos lípidos catiónicos.

5 Este ejemplo demuestra la eficacia de formulaciones de SNALP dirigidas a tumores que contienen diversos nuevos lípidos catiónicos descritos en el presente documento con un ARNpi que se dirige a cinasa 1 similar a polo (PLK-1) en un modelo de tumor distal de ratón. La secuencia de ARNpi para PLK-1 usada en este estudio se proporciona en la tabla 3 anterior.

10 Las formulaciones 7:54 SNALP que contenían ARNpi para PLK-1 encapsulado se prepararon con los siguientes lípidos catiónicos: (1) DLinDMA; (2) TLinDMA; (3) DLin-C1K-DMA (“DLin-K-DMA”); (4) DPanDMA; (5) DPan-C2-DMA (“C2-DPanDMA”); (6) DPan-C2K-DMA; (7) DPan-C3K-DMA; y (8) DPan-C1K6-DMA.

15 Se administró cada formulación de SNALP mediante inyección intravenosa (IV) a 3 mg/kg en ratones Scid que portaban tumores de Hep3B (n = 4 por grupo). Se extrajo tejido tumoral a las 24 horas después de la administración de la SNALP y se evaluaron los niveles tumorales de ARNm de PLK-1 efectuando un ensayo PLK-1/GAPDH QG. La tabla 5 proporciona una caracterización de las formulaciones de SNALP usadas en este estudio *in vivo*.

Tabla 5

% en moles PEG-lípido Catiónico Chol DPPC	Composición		Encaps. inicial (%)	Producto terminado		
	PEG-lípido	Lípido catiónico		Z-med (nm)	poli	Encaps. (%)
6,76 54,06 32,43 6,75	PEG750-C-DMA	DLinDMA	75	74	0,08	98
		TLinDMA	70	126	0,07	100
		DLin-C1K-DMA	56	84	0,05	98
		DPanDMA	75	76	0,08	100
		DPan-C2-DMA	86	81	0,06	100
		DPan-C2K-DMA	84	76	0,08	100
		DPan-C3K-DMA	86	81	0,06	100
		DPan-C1K6-DMA	71	80	0,06	99

20 La figura 13 ilustra que todos los lípidos catiónicos ensayados en la formulación 7:54 SNALP dirigida a tumores mostraron potencias similares para silenciar la expresión de PLK-1.

Ejemplo 10. Caracterización de la respuesta inflamatoria a formulaciones de SNALP dirigidas a tumores en sangre humana completa.

25 Pueden evaluarse las respuestas inflamatorias hacia SNALP dirigidas a tumores que contienen un ARNpi que se dirige a un gen de interés, tal como PLK-1 midiendo la inducción de citocinas *ex vivo* en muestras de sangre completa extraídas de sujetos humanos. En determinados casos, las SNALP pueden o bien no contener una carga de ARNpi (“vacías”), o contener una carga de ARNpi. Los ARNpi ensayados pueden incluir, por ejemplo, cualquiera de las moléculas de ARNpi para PLK-1 descritas en el presente documento. En resumen, se aísla sangre fresca, se diluye inmediatamente a 1:1 con solución salina al 0,9%, y se emplacaron 0,45 ml/pocillo en placas tratadas para cultivo tisular de 48 pocillos. Las SNALP se diluyen en PBS para formulación y se añaden a las muestras de sangre emplacadas a una concentración de 300 nM o 1200 nM. Después de 24 horas, se centrifugan las placas a 1200 rpm durante 20 minutos y se recoge el sobrenadante (plasma). La inducción de citocinas (por ejemplo, TNF α , IL-8, etc.) puede medirse mediante ELISA y/o una matriz citométrica de perlas.

40 En realizaciones particulares, el aumento del número de modificaciones de 2'OMe selectivas en la secuencia de ARNpi (por ejemplo, modificaciones 2'OMe en las G y/o en los U en las regiones bicatenarias y/o de saliente 3' de la secuencia de ARNpi) puede reducir la respuesta inmunoestimuladora del ARNpi.

Ejemplo 11. Exploración de la actividad *in Vitro* e *in Vivo* de ARNpi para PLK-1 modificados en formulaciones de SNALP dirigidas a tumores.

45 Se modificaron ARNpi de PLK-1 con la misma secuencia de nucleótidos para que incorporasen un número creciente de patrones alternos de nucleótidos de 2'OMe. Se diseñaron diez hebras codificantes diferentes (S-1 a S-10) y 135 hebras codificantes diferentes (AS-A a AS-H y AS-1 a AS-127). Los ARNpi bicatenarios para PLK-1 se generaron mediante hibridación de mezcla y emparejamiento de todas las posibles combinaciones de hebras codificantes y hebras no codificantes. El número de modificaciones para los ARNpi bicatenarios para PLK-1 varió de 7 a 11 nucleótidos de 2'OMe en la región bicatenaria. Además, algunos de los patrones de modificación incluyen nucleótidos modificados con 2'OMe en el saliente 3' de una o ambas hebras del ARNpi, de tal forma que el número de modificaciones aumenta adicionalmente de aproximadamente 9 a aproximadamente 14 en la molécula completa de ARNpi. La tabla 6 muestra ARNpi bicatenarios ilustrativos para PLK-1 que fueron el resultado de la hibridación

ES 2 613 498 T3

de mezcla y emparejamiento de las hebras codificantes S-1 a S-10 con las hebras no codificantes AS-A a AS-H y AS-1 a AS-127.

Tabla 6

ARNpi	Secuencia de ARNpi para PLK-1	% modificación con 2'OMe	% modificación en región BC
PLK1424 S3/ASF	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	9/42 = 21,4%	7/38 = 18,4%
PLK1424 S3/AS1	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	10/42 = 23,8%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S3/AS3	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	10/42 = 23,8%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S3/AS4	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	10/42 = 23,8%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S3/AS5	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	10/42 = 23,8%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S3/AS6	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS7	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS8	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS9	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS10	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS11	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS12	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS13	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS14	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S3/AS15	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/ASF	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	10/42 = 23,8%	7/38 = 18,4%
PLK1424 S4/AS1	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S4/AS2	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S4/AS3	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S4/AS4	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	8/38 = 21,1%
PLK1424 S4/AS5	5'-AGAUCACCCUCCUAAAAUAUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	8/38 = 21,1%

ES 2 613 498 T3

ARNpi	Secuencia de ARNpi para PLK-1	% modificación con 2'OMe	% modificación en región BC
PLK1424 S4/AS6	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS7	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS8	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS9	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS10	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS11	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS12	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS13	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS14	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S4/AS15	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S9/ASF	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	11/42 = 26,2%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S9/AS1	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S9/AS2	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S9/AS3	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S9/AS4	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S9/AS5	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	12/42 = 28,6%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S9/AS6	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%
PLK1424 S9/AS7	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%
PLK1424 S9/AS8	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%
PLK1424 S9/AS9	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%
PLK1424 S9/AS10	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%
PLK1424 S9/AS11	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%
PLK1424 S9/AS12	5'-AGAUCACCCUCCUUAUUU-3' 3'- CUUCUAGUGGGAGGAUUUAU-5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 28,9%

ARNpi	Secuencia de ARNpi para PLK-1	% modificación con 2'OMe	% modificación en región BC
PLK1424 S9/AS13	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 289%
PLK1424 S9/AS14	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 289%
PLK1424 S9/AS15	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/ASF	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	12/42 = 28,6%	9/38 = 23,7%
PLK1424 S10/AS1	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S10/AS2	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S10/AS3	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S10/AS4	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S10/AS5	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	13/42 = 31,0%	10/38 = 26,3%
PLK1424 S10/AS6	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS7	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS8	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS9	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS10	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS11	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS12	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS13	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS14	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%
PLK1424 S10/AS15	5'- <u>GAUCACCCUCCUUAAAUAUU</u> -3' 3'- <u>CUUCUAGUGGGAGGAAUUUAU</u> -5'	14/42 = 33,3%	11/38 = 289%

Las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores (por ejemplo, 7:54 y/o 7:58 SNALP) que contenían dúplex para PLK-1 encapsulados tal como se describe en la tabla 6 pueden prepararse tal como se describe en el presente documento. Para los ensayos de actividad de ARNpi *in vitro*, las células, tales como Hep3B, HepG2, HT29, LS 174T, y Neuro2a pueden cultivarse en placas de 96 pocillos en presencia de ARNpi formulado en SNALP. La viabilidad celular puede evaluarse después de 72 h usando el colorante de resazurina CellTiter Blue (Promega Corp). Puede evaluarse la actividad de silenciamiento del ARNm de PLK-1 en placas duplicadas a las 24 h mediante el ensayo bDNA (Panomics Inc.). Puede evaluarse el nivel de actividad de la enzima caspasa 3 y 7 en las células tratadas con ARNpi usando el reactivo de sustrato fluorescente para caspasa 3/7 (Z-DEVD)2-rodamina 110 APO-One (Promega Corp).

Para los ensayos de actividad del ARNpi *in vivo*, puede utilizarse un modelo de tumor intrahepático. Los tumores hepáticos se establecen en ratones mediante inyección intrahepática directa de células Hep3B o Neuro2a. Se usan ratones scid/beige hembra (Charles River Laboratories) y/o ratones A/J macho (Jackson Laboratories) como hospedadores para los tumores de Hep3B o Neuro2a. Los animales pueden recibir Anafen mediante inyección SC inmediatamente antes de la cirugía. Puede anestesiarse a los ratones individuales mediante inhalación de gas de isoflurano y aplicarse un lubricante ocular para evitar una deshidratación excesiva del ojo. Mientras se les mantiene en anestesia con gas, puede efectuarse una sola incisión de 1,5 cm a lo largo de la línea media por debajo del esternón y exteriorizarse el lóbulo hepático lateral. Pueden inyectarse 1×10^6 células Hep3B o 1×10^5 células Neuro2a suspendidas en 25 μ l de PBS lentamente en el lóbulo con un ángulo agudo usando una jeringuilla Hamilton y una aguja del calibre 30. Entonces se aplica una torunda a la herida por punción para detener cualquier sangrado antes de suturar. Se deja que los ratones se recuperen de la anestesia en una jaula estéril y se les vigila continuamente durante 2-4 h antes de devolverlos a su jaula habitual. De ocho a 11 días después de implantar el tumor, los ratones pueden ser asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento. Las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores (por ejemplo, 7:54 y/o 7:58 SNALP) que contienen dúplex para PLK-1 encapsulados tal como se describen en la tabla 6 o control de vehículo de PBS se administran mediante inyección intravenosa convencional a través de la vena caudal lateral, calculados basándose en los mg de ARNpi/kg dependiendo del peso de cada animal individual (volumen de inyección de 10 ml/kg). Entonces se controlan los pesos corporales a lo largo de la duración del estudio como un indicador del desarrollo de carga tumoral y de tolerabilidad del tratamiento. Para los estudios de eficacia, se determinan los criterios de valoración en humanos definidos como subrogados para la supervivencia. Se efectúan evaluaciones por técnicos veterinarios cualificados basándose en una combinación de signos clínicos, pérdida de peso, y distensión abdominal para definir el día de eutanasia a causa de la carga tumoral.

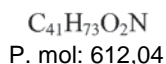
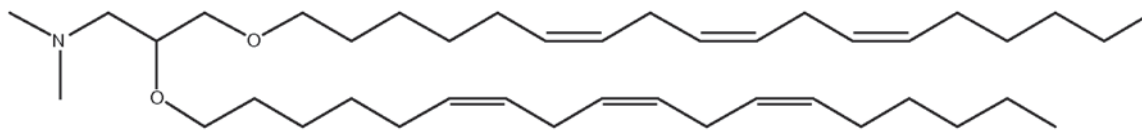
También puede usarse un modelo de tumor subcutáneo para los ensayos de actividad de ARNpi *in vivo*. Los tumores Hep3B pueden establecerse en ratones scid/beige hembra mediante inyección subcutánea de 3×10^6 células en 50 μ l de PBS en el flanco trasero izquierdo. Se asigna aleatoriamente a los ratones a los grupos de tratamiento 10-17 días después de que los tumores implantados se volviesen palpables. Las formulaciones de SNALP dirigidas a tumores (por ejemplo, 7:54 y/o 7:58 SNALP) que contenían dúplex para PLK-1 encapsulados tal como se describe en la tabla 6 se administran tal como se ha descrito anteriormente. Los tumores pueden medirse en 2 dimensiones (ancho x largo) para evaluar el crecimiento tumoral usando calibres digitales. El volumen tumoral puede calcularse usando la ecuación $a \times b \times b / 2$ en donde a y b = diámetros mayor y menor, respectivamente, y expresarse como media de grupo \pm DT.

Para los ensayos de actividad del ARNpi *in vivo*, puede medirse el ARNm humano para PLK-1 y GAPDH en lisados tumorales mediante el ensayo QuantiGene bDNA (Panomics) según las instrucciones del fabricante (Manual Quantigene 1.0). Pueden diseñarse conjuntos de sondas específicas de humano para PLK-1 (NM_005030) y GAPDH (NM_002046) para que tengan una reactividad cruzada mínima con el ARNm homólogo de ratón. Los datos pueden expresarse como la relación media de PLK-1:GAPDH \pm DT de los animales individuales.

En realizaciones particulares, el aumento del número de modificaciones de 2'OMe selectivas en la secuencia de ARNpi (por ejemplo, las modificaciones de 2'OMe en las G y/o U en las regiones bicatenaria y/o de saliente 3' de la secuencia de ARNpi) no reduce la actividad, y en algunos casos, aumenta la actividad de silenciamiento.

Ejemplo 12. Síntesis de 1,2-Di- γ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA).

γ -DLenDMA que tiene la estructura mostrada a continuación se sintetizó tal como se describe a continuación.



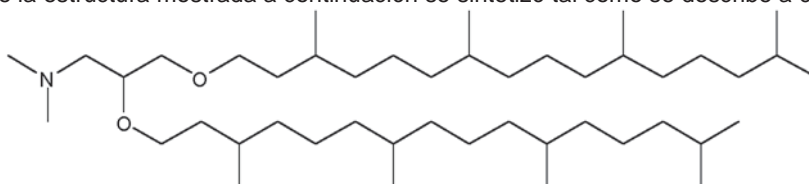
Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con 3-(dimetilamino)-1,2-propanodiol (0,8 g, 6,7 mmol), hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (1 g), mesilato de gamma linolenilo (ácido cis-6,9,12-octadecatrieno sulfónico) (5 g, 14,6 mmol), y 30 ml de tolueno. Después de agitar durante 15 minutos, la reacción se enfrió a 0-5°C. Se añadió lentamente una solución de hidróxido de sodio al 40% (15 ml). La reacción se dejó en agitación durante aproximadamente 48 horas. Se añadieron 15 ml adicionales de tolueno al vaso de reacción, junto con hidróxido de sodio al 40% (15 ml). Después de agitar la reacción durante 12 horas adicionales, se añadieron agua (50 ml) y acetato de isopropilo (50 ml) y se agitó durante 15 minutos. Después se transfirió la mezcla a un embudo de separación de 500 ml y se dejó que se separara. La fase acuosa inferior se descargó y la fase orgánica se lavó con cloruro de sodio saturado (2 x 50 ml). Ya que no pudieron separarse completamente las fases acuosa y orgánica de los lavados de cloruro de sodio saturado después de 20 minutos, la fase acuosa inferior (de un color ligeramente

amarillo) se descargó y se extrajo con cloroformo (75 ml). La fase orgánica se secó con MgSO_4 , se filtró y se evaporó el disolvente.

El producto en bruto, un líquido de color naranja, se purificó en una cromatografía en columna usando gel de sílice (60g) con un gradiente de metanol en diclorometano al 0-3% para dar 3,19 g. El producto se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (50 g) con un gradiente de acetato de etilo en hexanos al 10-30% para dar 1,26 g de producto puro.

Ejemplo 13. Síntesis de 1,2-Difitaniloxi-3-(*N,N*-dimetil)-propilamina (DPanDMA).

DPanDMA que tiene la estructura mostrada a continuación se sintetizó tal como se describe a continuación.

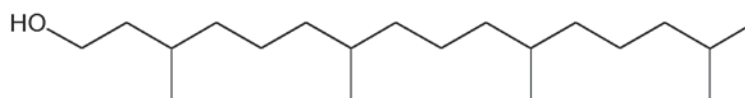


Masa exacta: 679,72

P. mol: 680,23

C, 79,46; H, 13,78; N, 2,06; O, 4,70

Etapas 1: Síntesis de fitanol:



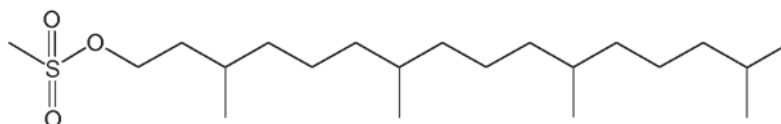
Masa exacta: 298,32

P. mol: 298,55

C, 80,46; H, 14,18; O, 5,36

Fitol (21,0 g, 70,8 mmol), etanol (180 ml) y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadió Níquel Raney 2800 (tal como se adquirió, una solución en agua al 50% en peso en caso de usarse tal como se adquirió, níquel > 89% del metal presente) (6,8 g, 51,5 mmol), y el matraz se selló y se descargó con nitrógeno. Se usó una aguja del calibre 12 para burbujear hidrógeno a través de la solución durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 5 días, usando un globo como depósito de hidrógeno. También se burbujear hidrógeno a través de la mezcla de reacción a las 24 h y a las 48 h, 5 minutos cada vez. El catalizador metálico se retiró después mediante filtración a través de Celite. Se concentró la solución etanólica, y se añadieron 200 ml de DCM al aceite resultante. La solución se lavó con agua (2 x 100 ml), se secó sobre MgSO_4 , y se concentró. La TLC indicó la formación del producto de fitanol, rendimiento 20,0 g.

Etapas 2: Síntesis de mesilato de fitanilo:



Masa exacta: 376,30

P. mol: 376,64

C, 66,97; H, 11,78; O, 12,74; S, 8,51

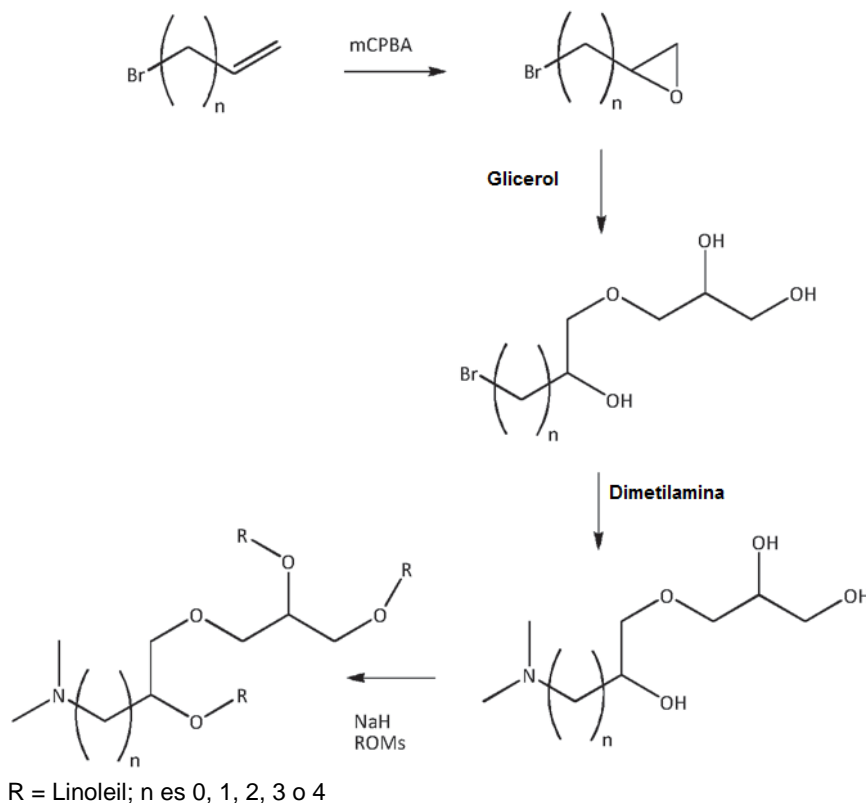
Fitanol (20,0 g, 66,7 mmol), trietilamina (18,6 ml, 133 mmol), y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 1000 ml. El matraz se selló y descargó con nitrógeno. Se añadió DCM anhidro (250 ml), y la mezcla se enfrió a -15°C (hielo y NaCl). Se añadió cloruro de mesilo (10,4 ml, 133 mmol) lentamente con una jeringuilla durante un periodo de 30 minutos, y la reacción se agitó a -15°C durante 1,5 horas adicionales. En este punto, la TLC mostró que el material de partida se había usado completamente. La solución se diluyó con DCM (250 ml) y se lavó con NaHCO_3 saturado (2 x 200 ml). Entonces se secó la fase orgánica (MgSO_4), se filtró, y se concentró (rotavapor). El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna. Rendimiento: 21,5 g, 85,7%.

Etapa 3: Síntesis de DPanDMA:

Se añadió hidruro de sodio (2,5 g, 100 mmol) a un matraz de fondo redondo de 250 ml, junto con benceno (40 ml) y una barra para agitación. En un vaso de precipitados de 50 ml, se preparó una solución a partir del *N,N*-Dimetil-3-aminopropano-1,2-diol (1,42 g, 12 mmol) y benceno (60 ml). Esto se añadió al vaso de reacción y la reacción se agitó durante 10 minutos (efervescencia). Se añadió el mesilato de fitanilo (10,52 g, 28 mmol) y después se acopló el matraz a un condensador, se descargó con nitrógeno, y se calentó a reflujo. Después de 18 horas, se retiró el matraz de la fuente de calor y se dejó enfriar. Se enrasó el volumen hasta 200 ml con benceno. Se añadió EtOH lentamente para inactivar el hidruro de sodio no reaccionado. Una vez que se había completado la inactivación, la mezcla de reacción se lavó dos veces con EtOH/H₂O, a una relación con el benceno de 1:1:0,6 benceno:agua:etanol. Las fases acuosas se combinaron y extrajeron con CHCl₃ (2 x 100 ml). Finalmente, se secó la fase orgánica (MgSO₄), se filtró, y se concentró (rotavapor). La purificación por cromatografía en columna proporcionó DPanDMA en forma de un aceite de color amarillo pálido (6,1 g, 8,97 mmol, 74,7%).

15 Ejemplo 14. Síntesis de lípidos catiónicos de la familia de TLinDMA.

El siguiente diagrama proporciona un esquema general para sintetizar miembros de la familia de lípidos catiónicos de C(n)-TLinDMA:



20

TLinDMA (1-(2,3-linoleiloxipropoxi)-2-(linoleiloxi)-(N,N-dimetil)-propil-3-amina) (Compuesto III) se sintetizó del modo siguiente:

25

Síntesis del compuesto I:

Se cargó un matraz de fondo redondo de 1000 ml con epibromohidrina (5 g, 37 mmol), glicerol (10 g, 110 mmol), una barra de agitación y después se descargó con nitrógeno. Se añadió cloroformo anhidro (350 ml) mediante una cánula, seguido de BF₃·Et₂O (0,5 ml, 3,7 mmol) y se sometió a reflujo durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se enfrió y después se agitó a temperatura ambiente durante una noche. Tras finalizar la reacción, la mezcla de reacción se concentró y el producto en bruto (15 g) se purificó mediante cromatografía en columna usando gel de sílice (150 g).

30

Síntesis del compuesto II:

Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con compuesto I (3,8 g, 17 mmol) y una barra de agitación. Después de descargar con nitrógeno, se añadió mediante una cánula dimetilamina en solución de alcohol metílico 2,0 M (170 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El progreso de la reacción

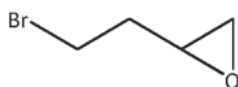
35

se controló mediante TLC. El producto en bruto se usó sin purificación adicional.

Síntesis de TLinDMA (Compuesto III):

5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con una barra de agitación, NaH (0,6 g, 24 mmol), y 25 ml de benceno. Posteriormente, el compuesto II (0,4 g, 2 mmol) se añadió seguido inmediatamente de sulfonato de linoleil metano (2,8 g, 8 mmol). La reacción se descargó con nitrógeno y se sometió a reflujo durante una noche. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 250 ml y se diluyó con benceno hasta un volumen final de 50 ml. La reacción se inactivó con etanol (30 ml) y después se lavó con agua (50 ml). La fase acuosa inferior se descargó y la mezcla de reacción se lavó de nuevo con etanol (30 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró, y se retiró el disolvente. El producto en bruto (2,3 g) se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (60 g) con un gradiente de metanol en diclorometano al 0-3%.

15 C2-TLinDMA (Compuesto VII) se sintetizó del modo siguiente: Síntesis del compuesto IV:



Fórmula química: C₄H₇BrO

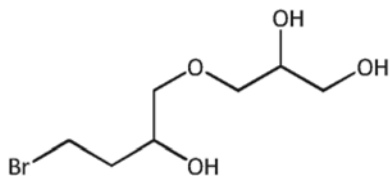
Masa exacta: 150,0

Peso molecular: 151,0

Análisis elemental: C, 31,82; H, 4,67; Br, 52,92; O, 10,60

20 Se preparó una solución de 4-bromo-1-buteno (11,5 g, 85 mmol) en CH₂Cl₂(anh., 120 ml) en atmósfera de nitrógeno en un RBF de 1000 ml con un agitador magnético. En un matraz separado, se preparó una solución de ácido 3-cloroperbenzoico (77%, PM 173, 44,05 g, 196 mmol) en CH₂Cl₂(anh., 250 ml) y se añadió a la mezcla de reacción mediante una cánula. La reacción se agitó durante 3 días, y después se concentró. El producto (mezcla de aceite/sólido de color blanco) se redisolvió en THF (300 ml) y se añadió una solución de ditionito de sodio al 4% (180 ml) para retirar el exceso de perácido. La mezcla (ahora nebulosa) se agitó durante 20 minutos y después se añadió EtOAc (750 ml). La mezcla se transfirió a un embudo de separación y la fase orgánica se lavó con agua (100 ml), NaHCO₃ sat. (2 x 300 ml, EFERVESCENCIA), agua de nuevo (300 ml) y salmuera (300 ml). La solución se concentró y el producto se purificó por cromatografía.

Síntesis del compuesto V:



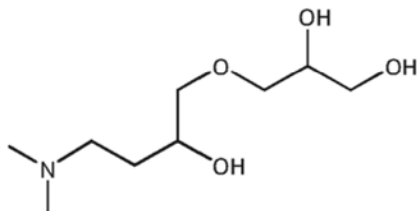
Fórmula química: C₇H₁₅BrO

Masa exacta: 242,0

Peso molecular: 243,0

35 Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con compuesto IV (1,3 g, 9 mmol), glicerol (2,5 g, 27 mmol), una barra de agitación y después se descargó con nitrógeno. Se añadió cloroformo anhidro (100 ml) mediante una cánula, seguido de BF₃·Et₂O (0,15 ml, 1,1 mmol) y se sometió a reflujo durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó posteriormente a temperatura ambiente durante toda la noche.

Síntesis del compuesto VI:



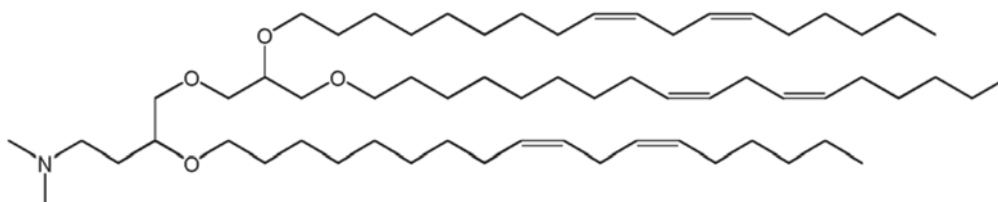
Fórmula química: C₉H₂₁NO₄

Masa exacta: 207,1

Peso molecular: 207,3

45 Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con compuesto V (0,3 g, 1,2 mmol) y una barra de agitación. Después de descargar con nitrógeno, se añadió mediante una jeringuilla dimetilamina en solución de alcohol metílico 2,0 M (25 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Se concentró la mezcla de reacción y el producto en bruto se usó sin purificación adicional.

50

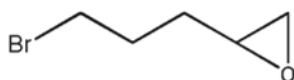
Síntesis de C2-TLinDMA (Compuesto VII):

Fórmula química: $C_{63}H_{117}NO_4$
 Masa exacta: 951,9
 Peso molecular: 952,6

- 5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con una barra de agitación, NaH (0,6 g, 24 mmol), y 25 ml de benceno. El compuesto VI (0,37 g, 1,8 mmol) se añadió seguido inmediatamente de sulfonato de linoleil metano (2,8 g, 8 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante toda la noche y se controló el proceso de la reacción mediante TLC. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 250 ml y se diluyó con benceno hasta un volumen final de 50 ml. La reacción se inactivó con etanol (30 ml) y después se lavó con agua (50 ml).
 10 La fase acuosa inferior se descargó y la mezcla de reacción se lavó de nuevo con etanol (30 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó con $MgSO_4$, se filtró, y se retiró el disolvente. El producto en bruto, 2,5 g, se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice (60 g), se eluyó con un gradiente de metanol en DCM al 0-3%.

C3-TLinDMA (Compuesto XI) se sintetizó del modo siguiente: Síntesis del compuesto VIII:

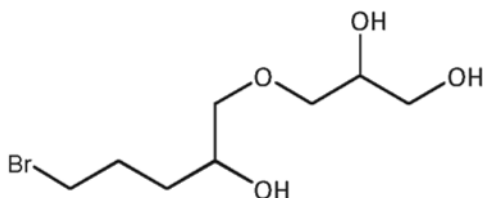
15



Fórmula química: C_5H_9BrO
 Masa exacta: 164,0
 Peso molecular: 165,0
 Análisis elemental: C, 36,39; H, 5,50; Br, 48,42; O, 9,69

- Se preparó una solución de 5-bromo-1-pentano (85 mmol) en CH_2Cl_2 (anh., 120 ml) en atmósfera de nitrógeno en un RBF de 1000 ml con un agitador magnético. En un matraz separado, se preparó una solución de ácido 3-cloroperbenzoico (77%, PM 173, 44,05 g, 196 mmol) en CH_2Cl_2 (anh., 250 ml) y se añadió a la mezcla de reacción mediante una cánula. La reacción se agitó durante 3 días, y después se concentró. El producto (mezcla de aceite/sólido de color blanco) se redisolvió en THF (300 ml) y se añadió una solución de ditionito de sodio al 4% (180 ml) para retirar el exceso de perácido. La mezcla (ahora nebulosa) se agitó durante 20 minutos y después se añadió EtOAc (750 ml). La mezcla se transfirió a un embudo de separación y la fase orgánica se lavó con agua (100 ml), $NaHCO_3$ sat. (2 x 300 ml, EFERVESCENCIA), agua de nuevo (300 ml) y salmuera (300 ml). La solución se concentró y el producto se purificó por cromatografía.

25

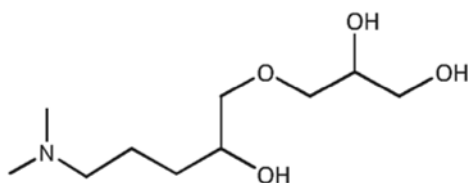
Síntesis del compuesto IX:

Fórmula química: $C_8H_{17}BrO_4$
 Masa exacta: 256,0
 Peso molecular: 257,1

30

- Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con compuesto VIII (1,3 g, 9 mmol), glicerol (2,5 g, 27 mmol), una barra de agitación y después se descargó con nitrógeno. Se añadió cloroformo anhidro (100 ml) mediante una cánula, seguido de $BF_3 \cdot Et_2O$ (0,15 ml, 1,1 mmol) y se sometió a reflujo durante 3 horas en atmósfera de nitrógeno.
 35 La mezcla de reacción se agitó posteriormente a temperatura ambiente durante toda la noche.

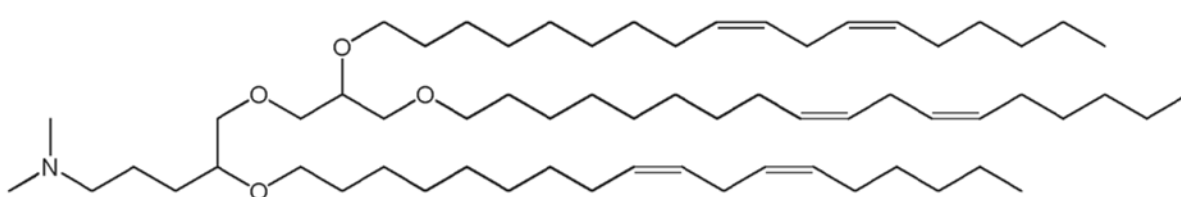
Síntesis del compuesto X:



Fórmula química: C₁₀H₂₃NO₄
 Masa exacta: 221,2
 Peso molecular: 221,3

5 Se cargó un matraz de fondo redondo de 50 ml con compuesto IX (0,3 g, 1,2 mmol) y una barra de agitación. Después de descargar con nitrógeno, se añadió mediante una jeringuilla dimetilamina en solución de alcohol metílico 2,0 M (25 ml). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. El progreso de la reacción se controló mediante TLC. Se concentró la mezcla de reacción y el producto en bruto se usó sin purificación adicional.

10 Síntesis de C3-TLinDMA (Compuesto XI):

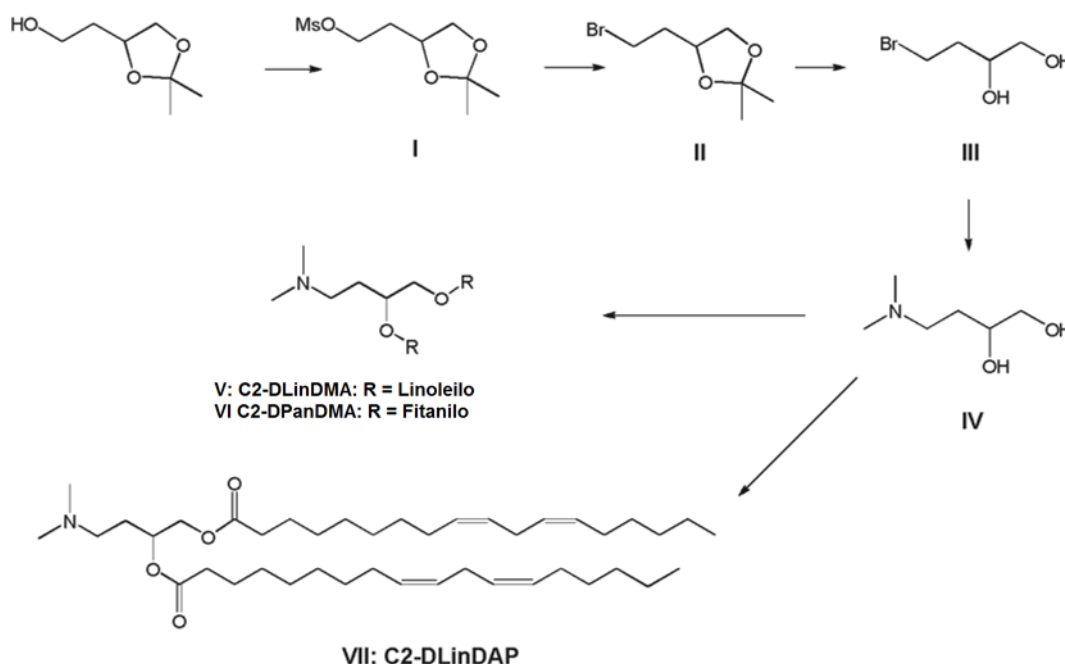


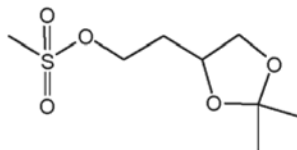
Fórmula química: C₆₄H₁₁₉NO₄
 Masa exacta: 969,9
 Peso molecular: 966,6

15 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con una barra de agitación, NaH (0,6 g, 24 mmol), y 25 ml de benceno. El compuesto X (0,37 g, 1,8 mmol) se añadió seguido inmediatamente de sulfonato de linoleil metano (2,8 g, 8 mmol). La reacción se sometió a reflujo durante toda la noche y se controló el proceso de la reacción mediante TLC. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 250 ml y se diluyó con benceno hasta un volumen final de 50 ml. La reacción se inactivó con etanol (30 ml) y después se lavó con agua (50 ml). La fase acuosa inferior se descargó y la mezcla de reacción se lavó de nuevo con etanol (30 ml) y agua (50 ml). La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró, y se retiró el disolvente. El producto en bruto, 2,5 g, se purificó usando
 20 cromatografía en columna sobre gel de sílice (60 g), se eluyó con un gradiente de metanol en DCM al 0-3%.

Ejemplo 15. Síntesis de nuevos lípidos C2.

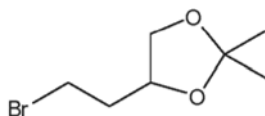
25 Se sintetizaron nuevos lípidos C2 (Compuestos V-VII) que tienen las estructuras mostradas a continuación tal como se muestra en el siguiente diagrama esquemático.



Etapa 1: Síntesis de 4-(2-metanosulfoniletil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (Compuesto I):

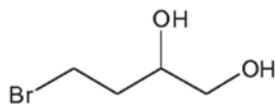
$C_8H_{16}O_5S$
 Masa exacta: 224,07
 P. mol: 224,28
 C. 42,84; H. 7,19; O. 34,67; S. 14,30

- 5 Se añadieron 4-(2-hidroxiethyl)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (25 g, 170 mmol), trietilamina (55,9 ml, 400 mmol), y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 1000 ml. El matraz se selló y descargó con nitrógeno. Se añadió DCM anhidro (600 ml), y la mezcla se enfrió a aproximadamente $-5^{\circ}C$ (hielo y NaCl). Se añadió cloruro de mesilo (19,9 ml, 255 mmol, 1,5 equiv.) lentamente con una jeringuilla durante un periodo de 60 minutos, y la reacción se agitó a $-5^{\circ}C$ durante 1,5 horas adicionales. En este punto, la TLC mostró que el material de partida se había consumido.
- 10 La solución se diluyó con DCM (350 ml), se dividió en dos porciones (~500 ml), y se trabajó cada porción del modo siguiente: la solución se transfirió a un embudo de separación de 1000 ml y se lavó con $NaHCO_3$ saturado (2 x 200 ml). Entonces se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se filtró, y se concentró (rotavapor). El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna. Rendimiento final: 32,0 g, 84,1%.

Etapa 2: Síntesis de 4-(2-Bromoetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (Compuesto II):

$C_7H_{13}BrO_2$
 Masa exacta: 208,01
 P. mol: 209,08
 C. 40,21; H. 6,27; Br. 38,22; O. 15,30

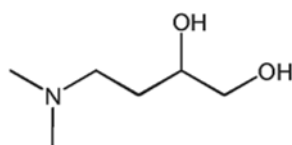
- 20 Se añadieron eterato de bromuro de magnesio (40 g, 130 mmol) y una barra de agitación a un matraz de fondo redondo de 2000 ml y se descargó con nitrógeno. Se añadió una solución de 4-(2-metanosulfoniletil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (I) (17,5 g, 78 mmol) en éter dietílico anhidro (900 ml) mediante una cánula, y la suspensión se agitó durante una noche. El éter se decantó en primer lugar en un vaso de precipitados. Se añadieron agua (200 ml) y éter (300 ml) al precipitado y se agitó durante 5 minutos. Se disolvió el precipitado, y después se recogió la fase de éter y se añadió a la solución de éter procedente de la reacción. Después se lavó la fase orgánica, se concentró a aproximadamente 500 ml, se lavó con agua, se secó sobre Mg_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró para dar un aceite de color amarillo (16,0 g). Esto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida para dar 10,6 g de producto (50,7 mmol, 65%).

Etapa 3: Síntesis de 4-Bromobutano-1,2-diol (Compuesto III):

$C_4H_9BrO_2$
 Masa exacta: 167,98
 P. mol: 169,02
 C. 28,42; H. 5,37; Br. 47,28; O. 18,93

- 35 Se añadió 4-(2-Bromoetil)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano (II) (9 g, 43 mmol) a un RBF de 500 ml con una barra de agitación. Se añadieron 100 ml de $MeOH:H_2O:HCl$ a una relación de (60:20:5). Después de 30 minutos, se añadió $NaHCO_3$ sat. (-75 ml) (efervescencia), hasta que una tira de pH indicó que la solución era básica. En este punto la mezcla era ligeramente nebulosa. Se añadió éter (300 ml) (con agitación) y desapareció la nebulosidad. La mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 1000 ml y se separaron las 2 fases. La extracción de la fase acuosa se repitió dos veces más (2 x 300 ml de éter). Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre $MgSO_4$ y se concentraron para dar un aceite incoloro (7,0 g), que se purificó mediante cromatografía en columna.

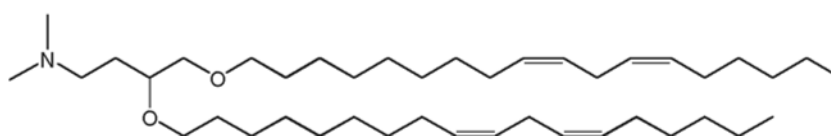
Etapa 4: Síntesis de 4-(dimetilamino)-1,2-butanodiol (Compuesto IV):



Fórmula química: $C_6H_{15}NO_2$
 Masa exacta: 133,1
 Peso molecular: 133,2
 Análisis elemental: C, 54,11; H, 11,35; N, 10,52; O, 24,03

Se añadió 4-Bromobutano-1,2-diol (III) (1 g, 6,0 mmol) a un RBF de 50 ml con una barra de agitación, se cerró herméticamente, y se descargó con nitrógeno. Se administraron 30 ml de dimetilamina (solución 2,0 M en MeOH) mediante una cánula y se agitó la reacción durante una noche. La TLC indicó que el material de partida había desaparecido. Se retiró el disolvente (y la DMA) mediante evaporación y el producto en bruto se usó sin purificación adicional.

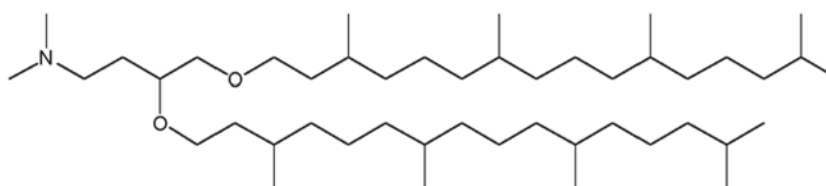
Síntesis de 1,2-Dilinoileloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDMA) (Compuesto V):



$C_{43}H_{79}NO_3$
 Masa exacta: 657,61
 P. mol: 658,09
 C. 78,48; H. 12,10; N. 2,13; O. 7,29

Se añadieron 4-(dimetilamino)-1,2-butanodiol (IV) (1,3 g, 3,4 mmol), mesilato de linoleilo (2,0 g, 5,8 mmol), hidrogenosulfato de tetrabutilamonio (0,5 g, 1,5 mmol), tolueno (30 ml), y una barra de agitación a un RBF de 100 ml. Se prepararon 30 ml de NaOH al 40% y se añadieron a la mezcla de reacción. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente, en atmósfera de nitrógeno durante 60 horas. Se añadieron agua desionizada (50 ml) y acetato de isopropilo (50 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente durante 10-15 min adicionales. La mezcla se transfirió a un embudo de separación de 250 ml y se dejó separar y se retiró la fase acuosa. La fase orgánica se lavó dos veces con agua (2 x 30 ml) usando MeOH para ayudar en la separación, y se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se filtró, y se concentró para obtener un aceite de color amarillo oscuro. El aceite se purificó mediante cromatografía en columna.

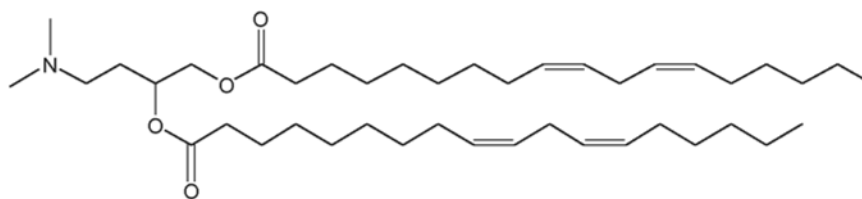
Síntesis de 1,2-difitaniloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DPanDMA) (Compuesto VI):



Fórmula química: $C_{46}H_{95}NO_2$
 Masa exacta: 693,7
 Peso molecular: 694,3
 Análisis elemental: C, 79,58; H, 13,79; N, 2,02; O, 4,61

Se añadió hidruro de sodio (360 mg, 15 mmol), benceno (40 ml), y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 50 ml. Se añadió 4-(dimetilamino)-1,2-butanodiol (IV) (200 mg, 1,5 mmol) y se agitó la reacción durante 10 minutos (efervescencia). Se añadió el mesilato de fitanilo (1,07 g, 2,92 mmol) y después se acopló el matraz a un condensador, se descargó con nitrógeno, y se calentó a reflujo. Después de 18 horas, se dejó enfriar el matraz hasta temperatura ambiente. Se enrasó el volumen hasta 40 ml con benceno. Se añadió EtOH lentamente para inactivar el hidruro de sodio no reaccionado. Una vez que se había completado la inactivación, la mezcla de reacción se lavó dos veces con EtOH/ H_2O , a una relación con el benceno de 1:1:0,6 benceno:agua:etanol. Se combinaron los lavados acuosos y se extrajeron con $CHCl_3$ (2 x 20 ml). Finalmente, se combinaron los extractos orgánicos, se secaron ($MgSO_4$), se filtraron, y se concentraron (rotavapor). La purificación por cromatografía en columna proporcionó un aceite de color amarillo pálido (250 mg, 0,145 mmol, 25%).

Síntesis de 1,2-Dilinoileloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDAP) (Compuesto VII):



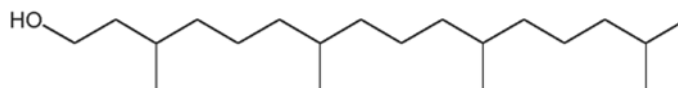
Fórmula química: $C_{42}H_{75}NO_4$
 Masa exacta: 657,6
 Peso molecular: 658,0
 Análisis elemental: C, 76,66; H, 11,49; N, 2,13; O, 9,73

Un matraz que contenía 4-(dimetilamino)-1,2-butanodiol (IV) (en bruto, 266 mg, 2 mmol (máx)), TEA (0,84 ml, 6 mmol), y DMAP (24 mg, 0,2 mmol) se descargó con nitrógeno antes de la adición de CH_2Cl_2 anhidro (50 ml). Se añadió cloruro de linoleoilo (1,2 g, 4 mmol) y la solución se agitó durante una noche. La solución se enjuagó en un embudo de separación de 250 ml con DCM (~70 ml) y se lavó con agua (2 x 50 ml). Se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se concentró, y se purificó mediante cromatografía.

Ejemplo 16. Síntesis de nuevos lípidos catiónicos de fitanilo.

DPan-C2K-DMA, DPan-C1K6-DMA, y DPan-C3K-DMA que tienen las estructuras mostradas a continuación se sintetizaron tal como se muestra en el siguiente diagrama esquemático.

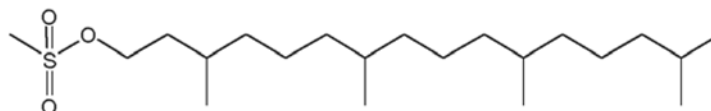
Síntesis de fitanol:



$C_{20}H_{42}O$
 Masa exacta: 298,32
 P. mol: 298,55
 C. 80,45; H. 14,18; O. 5,36

Fitol (21,0 g, 70,8 mmol), etanol (180 ml) y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se añadió Níquel Raney 2800 (tal como se adquirió, una solución en agua al 50% en peso en caso de usarse tal como se adquirió, níquel > 89% del metal presente) (6,8 g, 51,5 mmol), y el matraz se selló y se descargó con nitrógeno. Se usó una aguja del calibre 12 para burbujear hidrógeno a través de la solución durante 10 minutos. La reacción se agitó durante 5 días, usando un globo como depósito de hidrógeno. También se burbujear hidrógeno a través de la mezcla de reacción a las 24 h y a las 48 h, 5 minutos cada vez. El catalizador metálico se retiró después mediante filtración a través de Celite. Se concentró la solución etanólica, y se añadieron 200 ml de DCM al aceite resultante. La solución se lavó con agua (2 x 100 ml), se secó sobre $MgSO_4$, y se concentró. La TLC indicó la formación del producto de fitanol, rendimiento 20,0 g.

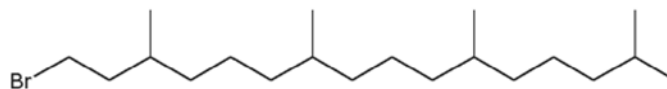
Síntesis de mesilato de fitanilo:



$C_{21}H_{44}O_3S$
 Masa exacta: 376,30
 P. mol: 376,64
 C. 66,97; H. 11,78; O. 12,74; S. 8,51

Fitanol (20,0 g, 66,7 mmol), trietilamina (18,6 ml, 133 mmol) y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 1000 ml. El matraz se selló y descargó con nitrógeno. Se añadió DCM anhidro (250 ml), y la mezcla se enfrió a $-15^\circ C$ (hielo y NaCl). Se añadió cloruro de mesilo (10,4 ml, 133 mmol) lentamente con una jeringuilla durante un periodo de 30 minutos, y la reacción se agitó a $-15^\circ C$ durante 1,5 horas adicionales. En este punto, la TLC mostró que el material de partida se había usado completamente. La solución se diluyó con DCM (250 ml) y se lavó con $NaHCO_3$ saturado (2 x 200 ml). Entonces se secó la fase orgánica ($MgSO_4$), se filtró y se concentró (rotavapor). El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna. Rendimiento 21,5 g, 85,7%.

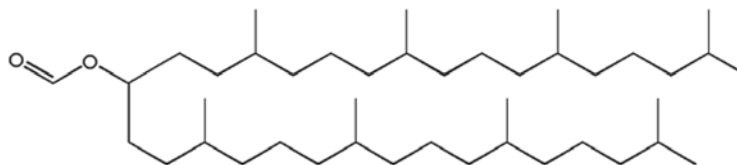
Síntesis de bromuro de fitanilo:



Fórmula química: $C_{20}H_{41}Br$
 Masa exacta: 360,2
 Peso molecular: 361,4
 Análisis elemental: C, 66,46; H, 11,43; Br, 22,11

- 5 Se añadieron eterato de bromuro de magnesio (17 g, 55 mmol) y una barra de agitación se añadieron a un matraz de fondo redondo de 500 ml. Se selló el matraz y se descargó con nitrógeno y se añadió éter de dietilo anhidro (200 ml) mediante una cánula. También se añadió una solución de mesilato de fitanilo (10,9 g, 28,9 mmol (FW = 377)) en éter anhidro (50 ml) mediante una cánula, y la suspensión se agitó durante una noche. A la mañana siguiente se había formado un precipitado en el lateral del matraz. Se añadió agua enfriada (200 ml) (con ppte disuelto) y la mezcla se transfirió a un embudo de separación de 1000 ml. Después de agitarla, la fase orgánica se separó.
- 10 Entonces se extrajo la fase acuosa con éter (2 x 150 ml) y se combinaron todas las fases de éter. La fase de éter se lavó con agua (2 x 150 ml), salmuera (150 ml) y se secó sobre Mg_2SO_4 anhidro. Se filtró la solución, se concentró, y se purificó mediante cromatografía ultrarrápida. Rendimiento final 9,5 g (26,3 mmol, 91,1%).

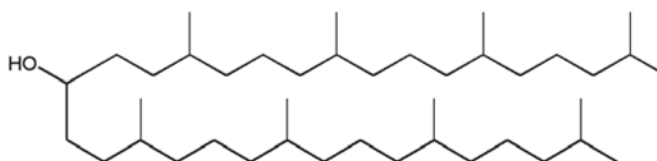
15 Síntesis del compuesto A:



Fórmula química: $C_{42}H_{84}O_2$
 Masa exacta: 620,65
 Peso molecular: 621,12
 Análisis elemental: C, 81,22; H, 13,63; O, 5,15

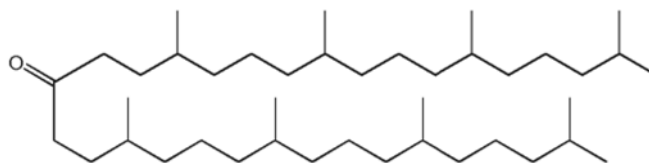
- 20 Se añadieron giros de magnesio (720 mg, 30 mmol), un cristal de yodo, y una barra de agitación a un matraz de fondo redondo de 500 ml. El matraz se descargó con nitrógeno y se añadió éter de dietilo anhidro (200 ml) mediante una cánula. Se añadió una solución de bromuro de fitanilo (9,5 g, 26,3 mmol) en éter anhidro (20 ml) y la mezcla nebulosa resultante se sometió a reflujo durante una noche. La mezcla se enfrió a TA y, sin retirar la base inferior o el condensador, se añadió formiato de etilo (2,2 g, 2,41 ml, 30 mmol) mediante una jeringuilla y una aguja del calibre 12. La adición se efectuó gota a gota, directamente en la mezcla de reacción, y la suspensión nebulosa se agitó de nuevo durante una noche. La M.R. se transfirió a un embudo de separación de 500 ml con éter (50 ml), y se lavó con H_2SO_4 al 10% (100 ml - la M.R. se aclaró entonces tras agitarla), agua (2 x 100 ml) y salmuera. La fase orgánica se secó sobre Mg_2SO_4 anhidro, se filtró, y se concentró. El rendimiento (en bruto) fue de 8 g. La TLC indicó que la mayoría del producto era el formiato de difitanilmetilo, que se purificó por cromatografía (éter en hexano al 0 - 6%).

30 Síntesis del compuesto B:



Fórmula química: $C_{41}H_{84}O$
 Masa exacta: 592,65
 Peso molecular: 593,11
 Análisis elemental: C, 83,03; H, 14,28; O, 2,70

- 35 El formiato (A) purificado (5,5 g, 8,86 mmol) se transfirió después a un matraz de fondo redondo de 1000 ml con una barra de agitación y se añadieron EtOH al 90% (500 ml) y KOH (2,0 g, 35,7 mmol). La mezcla de reacción era transparente, y se agitó durante una noche. Al día siguiente se concentró la mezcla mediante un rotavapor hasta un 50% de su volumen y después se vertió en 200 ml de HCl al 5%. La fase acuosa se extrajo con éter (3 x 100 ml). Los extractos de éter combinados se lavaron con agua (3 x 200 ml), se secaron ($MgSO_4$), y se concentraron. La TLC (DCM) reveló que la producción se había producido limpiamente hasta su compleción, y el producto (5,5 g, 100%) se usó sin purificación adicional.
- 40

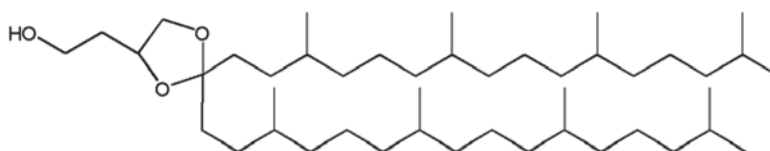
Síntesis del compuesto C:

Fórmula química: $C_{41}H_{82}O$
 Masa exacta: 590,6
 Peso molecular: 591,1
 Análisis elemental: C, 83,31; H, 13,98; O, 2,71

- 5 A una mezcla del compuesto B (5,5 g, 9,3 mmol), se le añadió clorocromato de piridinio (PCC) (5,5 g, 25,5 mmol) y carbonato de sodio anhidro (0,6 g, 5,66 mmol) en DCM. La suspensión resultante se agitó durante 1 h, pero la TLC indicó que aún quedaba cierta cantidad de material de partida (SM). La suspensión se agitó durante una hora más, y pareció que había progresado ligeramente, pero no hasta completarse. Se añadieron PCC (1,0 g) y carbonato de sodio (0,2 g) adicionales y la reacción se agitó durante una noche. La reacción había avanzado en este caso hasta
- 10 completarse. Entonces se añadió éter (300 ml) a la mezcla y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de sílice (300 ml), lavando el lecho con éter (3 x 100 ml). Se combinaron las fases de éter, se concentraron, y se purificaron para dar 5,0 g (90%) de cetona.

Síntesis del compuesto D:

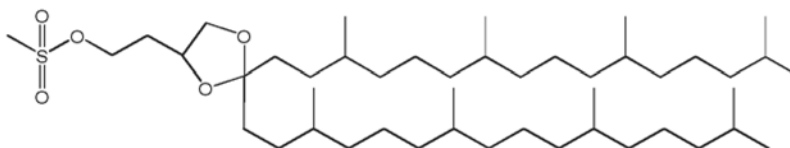
15



Fórmula química: $C_{45}H_{90}O_3$
 Masa exacta: 678,69
 Peso molecular: 679,19
 Análisis elemental: C, 79,58; H, 13,36; O, 7,07

- Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con compuesto C (1,4 g, 2,4 mmol), 1, 2, 4-butanotriol (0,51 g, 4,8 mmol), p-toluenosulfonato de piridinio (0,06 g, 0,24 mmol), y una barra de agitación. El vaso de reacción se
- 20 descargó con nitrógeno y se añadió tolueno anhidro (30 ml) mediante una cánula. Se equipó al matraz con un tubo de Dean-Stark y un condensador y se descargó con nitrógeno. La reacción se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante una noche y el progreso de la reacción se controló mediante TLC. Después de someterla a reflujo durante tres horas, se retiró la solución de reacción depositada en el tubo de Dean-Stark mediante una jeringuilla (20 ml) y se rellenoó el vaso de reacción inmediatamente con tolueno reciente (20 ml). Esto se repitió cada hora,
- 25 hasta un total de tres veces, y después se dejó en reflujo suavemente durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 250 ml con tolueno (2 x 5 ml), se lavó con Na_2CO_3 acuoso al 5% (2 x 50 ml), agua (50 ml), y se secó sobre $MgSO_4$. La evaporación del disolvente proporcionó 1,67 g de producto en bruto que se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (50 g) usando como eluyente diclorometano. Rendimiento: 1,4 g, 2,06 mmol, 86%.

30

Síntesis del compuesto E:

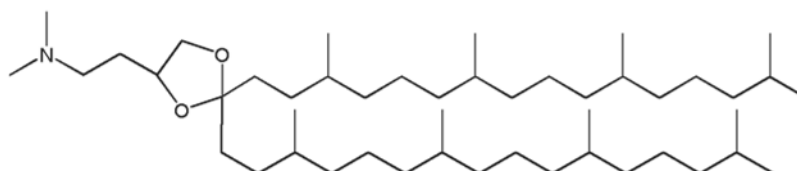
Fórmula química: $C_{46}H_{92}O_5S$
 Masa exacta: 756,67
 Peso molecular: 757,28
 Análisis elemental: C, 72,96; H, 12,25; O, 10,56; S, 4,23

- 35 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con compuesto D (1,4 g, 2,06 mmol) y una barra de agitación. El vaso se descargó con nitrógeno y se añadió DCM (25 ml). Posteriormente, se añadió trietilamina (0,72 g, 7,1 mmol, 0,99 ml) mediante una jeringuilla y la solución resultante se enfrió a $-15^\circ C$ (NaCl, hielo). En otro matraz de fondo redondo de 50 ml, se preparó una solución de anhídrido metanosulfónico (0,74 g, 4,1 mmol) y DCM (20 ml). Esta

solución se añadió gota a gota a la solución anterior durante un periodo de 30 minutos. El vaso de reacción se mantuvo a -15°C . La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló mediante TLC. Después se diluyó la mezcla de reacción con DCM (25 ml), y se lavó con NaHCO_3 (2×30 ml), después se secó sobre MgSO_4 anhidro. El producto en bruto (1,7g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

5

Síntesis de DPan-C2K-DMA:



Fórmula química: $\text{C}_{47}\text{H}_{95}\text{NO}_2$

Masa exacta: 705,74

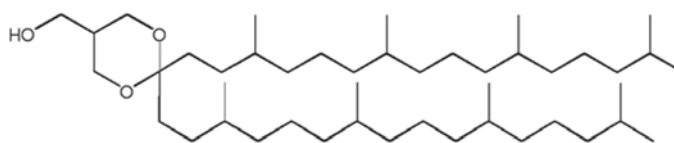
Peso molecular: 706,26

Análisis elemental: C, 79,93; H, 13,56; N, 1,98; O, 4,53

10 Se cargó un matraz de fondo redondo de 500 ml con compuesto E en bruto (1,7 g, 2,5 mmol) y una barra de agitación. El vaso de reacción se descargó con nitrógeno y dimetilamina en THF (2,0 M, 65 ml) y después se añadió con una jeringuilla. La mezcla de reacción se agitó durante tres días a temperatura ambiente. La reacción se concentró y el producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna usando gel de sílice (40 g) con un gradiente de metanol en diclorometano al 0-5%.

15

Síntesis del compuesto F:



Fórmula química: $\text{C}_{45}\text{H}_{90}\text{O}_3$

Masa exacta: 678,69

Peso molecular: 679,19

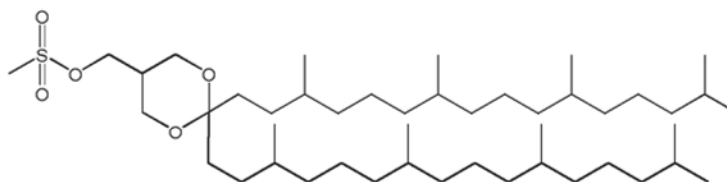
Análisis elemental: C, 79,58; H, 13,36; O, 7,07

20 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con compuesto C (1,2 g, 2,1 mmol), 2-hydroximetil-1, 3-propanodiol (0,45 g, 4,2 mmol), p-toluenosulfonato de piridinio (0,05 g, 0,21 mmol), y una barra de agitación. El vaso de reacción se descargó con nitrógeno y posteriormente se añadió tolueno anhidro (45 ml) mediante una cánula. Se equipó al matraz con un tubo de Dean-Stark y un condensador y se descargó con nitrógeno. La reacción se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante una noche y el progreso de la reacción se controló mediante TLC.

25 Después de someterla a reflujo durante tres horas, se retiró la solución de reacción depositada en el tubo de Dean-Stark mediante una jeringuilla (20 ml) y se relleno el vaso de reacción inmediatamente con tolueno reciente (20 ml). Esto se repitió cada hora, hasta un total de tres veces, y después se dejó en reflujo suavemente durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 250 ml con tolueno (2×5 ml), se lavó con Na_2CO_3 acuoso al 5% (2×50 ml), agua (50 ml), y se secó sobre MgSO_4 . La

30 evaporación del disolvente dio 1,44 g de producto en bruto que después se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (35 g) con un gradiente de metanol en diclorometano al 0-3%.

Síntesis del compuesto G:



Fórmula química: $\text{C}_{46}\text{H}_{92}\text{O}_5\text{S}$

Masa exacta: 756,67

Peso molecular: 757,28

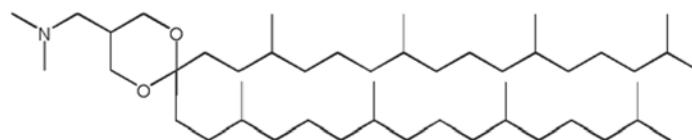
Análisis elemental: C, 72,96; H, 12,25; O, 10,56; S, 4,23

35

Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con compuesto F (1,2 g, 1,8 mmol) y una barra de agitación. El vaso se descargó con nitrógeno y se añadió DCM (25 ml). Posteriormente, se añadió trietilamina (0,62 g, 6,1 mmol),

0,85 ml) mediante una jeringuilla y la solución resultante se enfrió a -15°C (NaCl, hielo). En otro matraz de fondo redondo de 50 ml, se preparó una solución de anhídrido metanosulfónico (0,67 g, 3,7 mmol) y DCM (20 ml). Esta solución se añadió gota a gota a la solución anterior durante un periodo de 30 minutos. El vaso de reacción se mantuvo a -15°C durante la adición. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante una noche y se controló mediante TLC. Después se diluyó la mezcla de reacción con DCM (25 ml) y se lavó con NaHCO_3 (2×30 ml), después se secó sobre MgSO_4 anhidro. El producto en bruto (1,6 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis de DPan-C1K6-DMA:



Fórmula química: $\text{C}_{47}\text{H}_{95}\text{NO}_2$

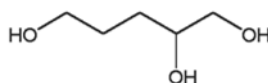
Masa exacta: 705,74

Peso molecular: 706,26

Análisis elemental: C, 79,93; H, 13,56; N, 1,98; O, 4,53

Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con compuesto G en bruto (1,6 g, 2,1 mmol) y una barra de agitación. El vaso de reacción se descargó con nitrógeno y dimetilamina en THF (2,0 M, 60 ml) y después se añadió con una jeringuilla. La mezcla de reacción se agitó durante seis días a temperatura ambiente. Después de que se hubiera evaporado el disolvente, el producto en bruto se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice (30 g) con un gradiente de acetato de etilo en hexanos al 0-30%.

Síntesis del compuesto H:



Fórmula química: $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}_3$

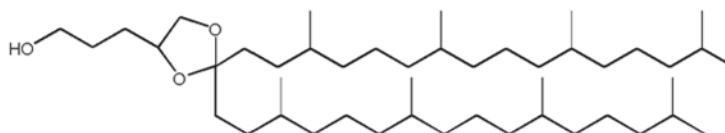
Masa exacta: 120,08

Peso molecular: 120,15

Análisis elemental: C, 49,98; H, 10,07; O, 39,95

Se cargó un matraz de 50 ml de fondo redondo con (R)- γ -hidroximetil- γ -butirolactona (1,0 g, 8,6 mmol), se descargó con nitrógeno, y se selló con un septo de goma. Posteriormente se añadió THF anhidro (40 ml) mediante una jeringuilla. La solución de (R)- γ -hidroximetil- γ -butirolactona se añadió después gota a gota en atmósfera de nitrógeno a una solución preparada que contenía LiAlH_4 (3,5 g, 92 mmol) en 160 ml de THF anhidro. Durante la adición, el vaso de reacción se mantuvo a 0°C . La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante una noche. La mezcla de reacción se enfrió a 0°C y se añadió salmuera (10-22 ml) muy lentamente usando una pipeta Pasteur. La mezcla se agitó en atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante una noche. El sólido de color blanco se filtró y se lavó con THF (3×25 ml). Las fases orgánicas se combinaron y se concentraron. Después de haber retirado el disolvente, el producto en bruto parecía contener agua junto con un residuo oleoso; por lo tanto, se sometió el producto en bruto a destilación azeotrópica en etanol (100 ml) dando como resultado un aceite de color amarillo. El producto en bruto (0,45 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del compuesto I:



Fórmula química: $\text{C}_{46}\text{H}_{92}\text{O}_3$

Masa exacta: 692,70

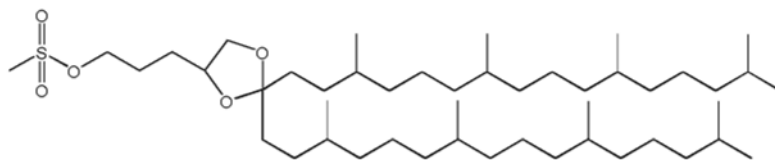
Peso molecular: 693,22

Análisis elemental: C, 79,70; H, 13,38; O, 6,92

Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con compuesto C (1,0 g, 1,8 mmol), compuesto H (en bruto, 0,450 g, 3,6 mmol), p-toluenosulfonato de piridinio (0,05 g, 0,24 mmol), y una barra de agitación. El vaso de reacción se descargó con nitrógeno y posteriormente se añadió tolueno anhidro (45 ml) mediante una cánula. Se equipó al matraz con un tubo de Dean-Stark y un condensador y se descargó con nitrógeno. La reacción se sometió a reflujo en atmósfera de nitrógeno durante una noche y el progreso de la reacción se controló mediante TLC. Después de

5 someterla a reflujo durante tres horas, se retiró la solución de reacción depositada en el tubo de Dean-Stark mediante una jeringuilla (20 ml) y se rellenó el vaso de reacción inmediatamente con tolueno reciente (20 ml). Esto se repitió cada hora, hasta un total de cinco veces, y después se dejó en reflujo suavemente durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se transfirió a un embudo de separación de 250 ml con tolueno (2 x 5 ml), se lavó con Na₂CO₃ acuoso al 5% (2 x 50 ml), agua (50 ml), y se secó sobre MgSO₄. La evaporación del disolvente proporcionó 1,13 g de producto en bruto que después se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (30 g) usando como eluyente diclorometano. Rendimiento, 1,0 g.

10 Síntesis del compuesto J:



Fórmula química: C₄₇H₉₄O₅S

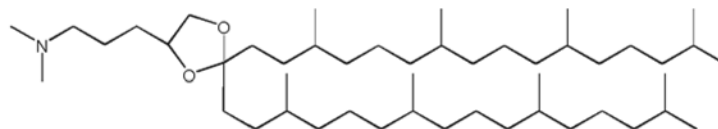
Masa exacta: 770,68

Peso molecular: 771,31

Análisis elemental: C, 73,19; H, 12,28; O, 10,37; S, 4,16

15 Se cargó un matraz de fondo redondo de 250 ml con compuesto I (1,0 g, 1,44 mmol) y una barra de agitación. El vaso se descargó con nitrógeno y se añadió DCM (25 ml). Posteriormente, se añadió trietilamina (0,51 g, 5 mmol, y 0,7 ml) mediante una jeringuilla y la solución resultante se enfrió a -15°C (NaCl, hielo). En otro matraz de fondo redondo de 50 ml, se preparó una solución de anhídrido metanosulfónico (0,54 g, 3,0 mmol) y DCM anhidro (20 ml). Esta solución se añadió gota a gota a la solución anterior durante un periodo de 30 minutos. El vaso de reacción se mantuvo a -15°C. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y se controló mediante TLC. Después se diluyó la mezcla de reacción con DCM (25 ml) y se lavó con NaHCO₃ (2 x 30 ml), después se secó sobre MgSO₄ anhidro. El producto en bruto (1,2 g) se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

20 Síntesis de DPan-C3K-DMA:



Fórmula química: C₄₈H₉₇NO₂

Masa exacta: 719,75

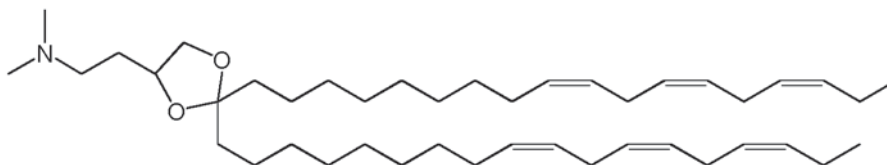
Peso molecular: 720,29

Análisis elemental: C, 80,04; H, 13,57; N, 1,94; O, 4,44

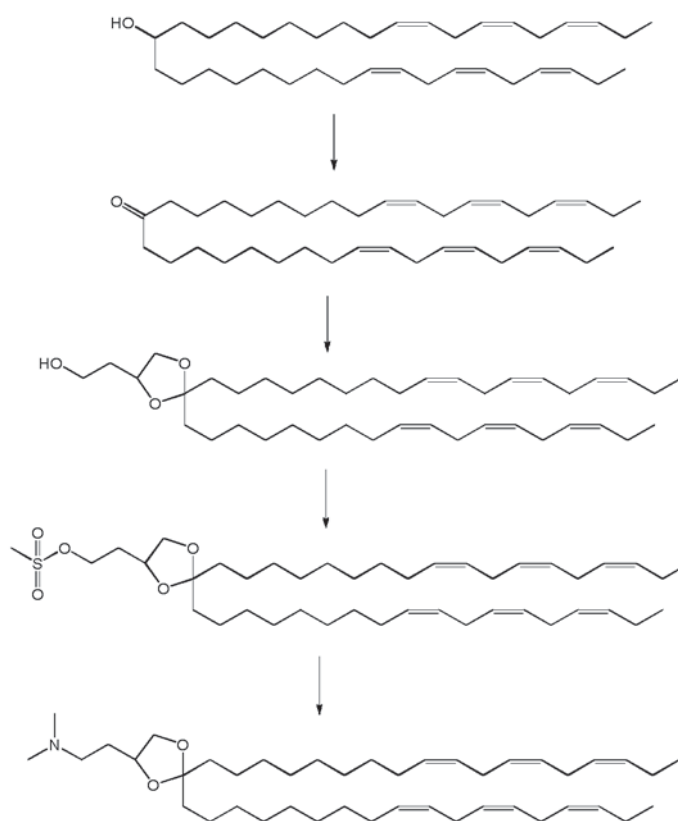
25 Se cargó un matraz de fondo redondo de 100 ml con compuesto J en bruto (1,2 g, 1,6 mmol) y una barra de agitación. El vaso de reacción se descargó con nitrógeno y dimetilamina en THF (2,0 M, 45 ml) y después se añadió con una jeringuilla. La mezcla de reacción se agitó durante cuatro días a temperatura ambiente. Después de que se hubiera evaporado el disolvente, el producto en bruto se purificó usando cromatografía en columna sobre gel de sílice (30 g) con un gradiente de acetato de etilo en hexanos al 0-30%.

30 **Ejemplo 17. Síntesis de DLen-C2K-DMA.**

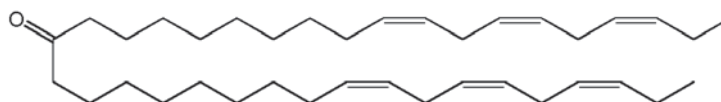
35 DLen-C2K-DMA que tiene la estructura mostrada a continuación se sintetizó tal como se muestra en el siguiente diagrama.



DLen-C2K-DMA



Síntesis de dilinolenil cetona:

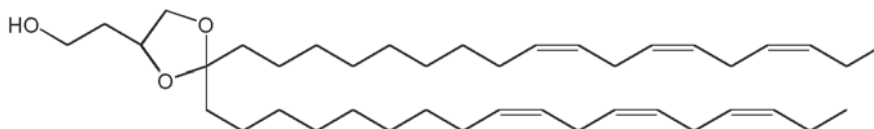


5

A un RBF de 1000 ml que contenía una solución de dilinolenil metanol (6,0 g, 11,4 mmol) en DCM anh. (200 ml) se le añadió clorocromato de piridinio (7,39 g, 34,2 mmol), carbonato sódico anh. (1,0 g, 5,66 mmol) y una barra de agitación. La suspensión resultante se agitó en atmósfera de nitrógeno a TA durante 3 h, tiempo tras el cual la TLC indicó que todo el SM se había consumido. Entonces se añadió éter (300 ml) a la mezcla y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de sílice (300 ml), lavando el lecho con éter (3 x 100 ml). Se combinaron las fases de éter, se concentró y se purificó para dar 4,2 g (8,0 mmol, 70%) de la cetona.

10

Síntesis de linolenil cetal:

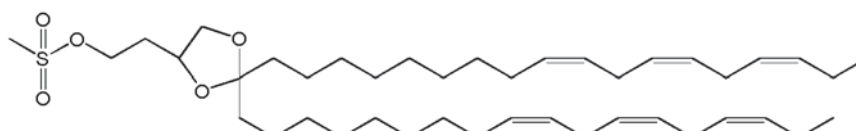


15

Se cargó un RBF de 100 ml con dilinolenil cetona (4,2 g, 8,2 mmol), 1,2,4-butanotriol (3,4 g, 32 mmol), PPTS (200 mg, 0,8 mmol) y una barra de agitación. El matraz se descargó con nitrógeno y se añadió tolueno anhidro (60 ml). Se dotó el vaso de reacción con un tubo de Dean-Stark y un condensador y se llevó hasta reflujo y se dejó la reacción durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con tolueno (50 ml), y se lavó con Na₂CO₃ acuoso al 5% (2 x 50 ml), agua (50 ml), se secó (MgSO₄) y se purificó mediante cromatografía para dar 3,0 g (4,9 mmol, 59%) del cetal.

20

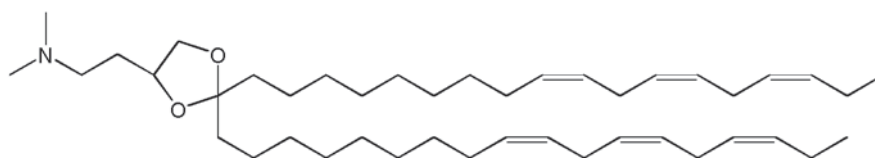
Formación del mesilato:



25

5 Se cargó un RBF de 250 ml con el linolenil cetal (3,0 g, 4,9 mmol), TEA (2,2 ml, 15,6 mmol) y una barra de agitación. El matraz se descargó con nitrógeno, se añadió DCM anh. (20 ml), y la solución se enfrió a -15°C. En otro matraz de 50 ml, se preparó una solución de MsCl (9,7 mmol, 2 equiv.) en DCM anhidro (30 ml), después se transfirió al vaso de reacción mediante una jeringuilla durante 20 minutos. La reacción se agitó durante 90 minutos a -15°C, tras lo cual el material de partida se había consumido. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml adicionales de DCM, se lavó con NaHCO₃ (2 x 50 ml), se secó (MgSO₄) y se purificó por cromatografía. Rendimiento final de 3,1 g, 4,5 mmol, 92%.

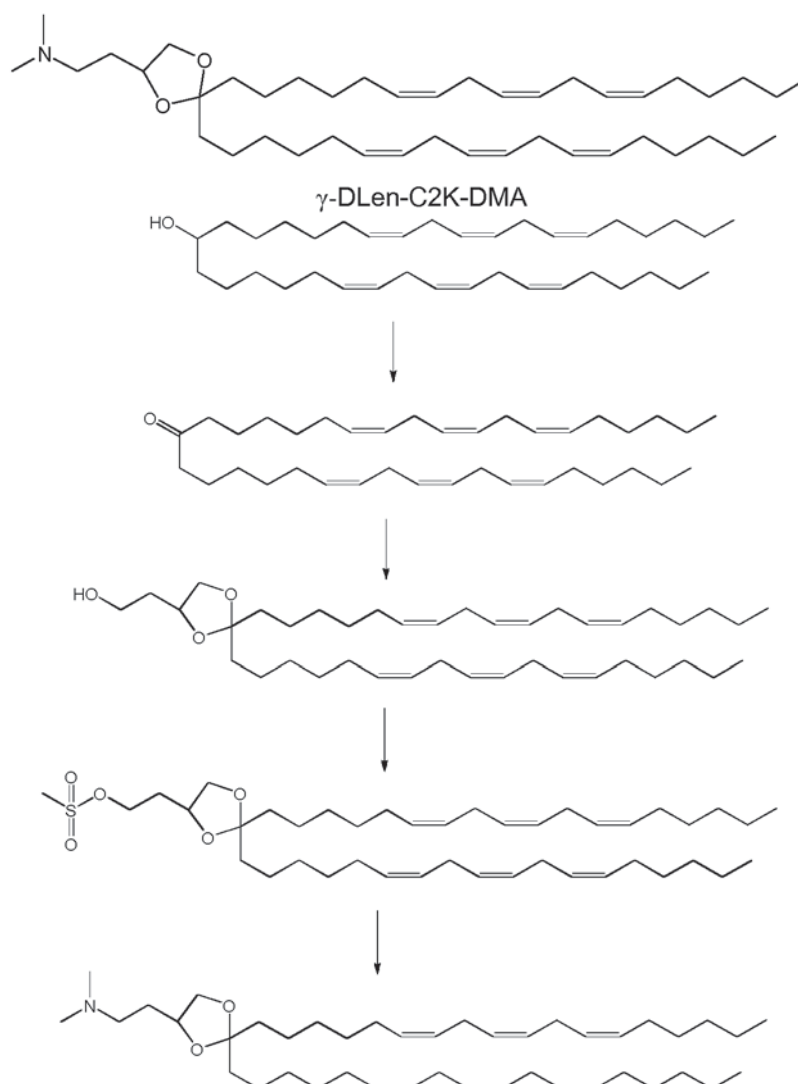
10 Síntesis de DLen-C2K-DMA:

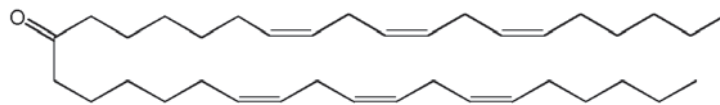


15 Se cargó un RBF de 250 ml con el mesilato (3,0 g, 4,35 mmol), isopropanol (25 ml) y una barra de agitación. El matraz se descargó con nitrógeno, se cerró herméticamente, y se añadió una solución 2,0 M de dimetilamina en metanol (120 ml) mediante una cánula. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La solución se concentró y purificó mediante cromatografía. Rendimiento final de 2,49 g, 3,9 mmol, 90%.

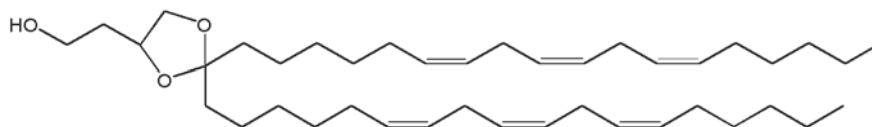
Ejemplo 18. Síntesis de γ -DLen-C2K-DMA.

20 γ -DLen-C2K-DMA que tiene la estructura mostrada a continuación se sintetizó tal como se muestra en el siguiente diagrama.

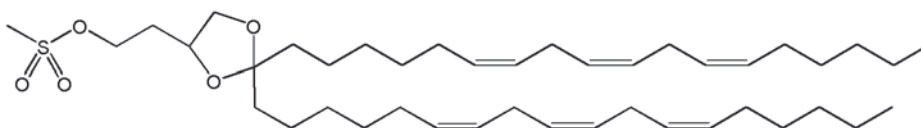


Síntesis de di- γ -linolenil cetona:

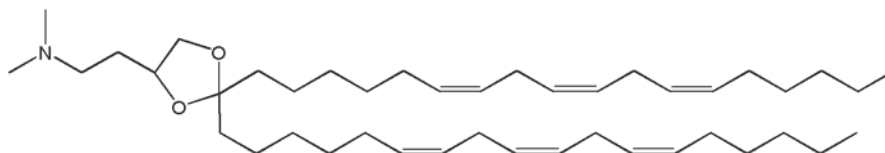
- 5 A un RBF de 1000 ml que contenía una solución de di- γ -linolenil metanol (6,0 g, 11,4 mmol) en DCM anh. (200 ml) se le añadió clorocromato de piridinio (7,39 g, 34,2 mmol), carbonato sódico anh. (1,0 g, 5,66 mmol) y una barra de agitación. La suspensión resultante se agitó en atmósfera de nitrógeno a TA durante 3 h, tiempo tras el cual la TLC indicó que todo el SM se había consumido. Entonces se añadió éter (300 ml) a la mezcla y la suspensión de color pardo resultante se filtró a través de un lecho de sílice (300 ml), lavando el lecho con éter (3 x 100 ml). Se combinaron las fases de éter, se concentró y se purificó para dar 5,5 g (10,5 mmol, 92%) de cetona.

Síntesis de γ -linolenil cetal:

- 15 Se cargó un RBF de 100 ml con di- γ -dilinolenil cetona (2,14 g, 4,1 mmol), 1,2,4-butanotriol (1,7 g, 16,0 mmol), PPTS (100 mg, 0,4 mmol) y una barra de agitación. El matraz se descargó con nitrógeno y se añadió tolueno anhidro (30 ml). Se dotó el vaso de reacción con un tubo de Dean-Stark y un condensador y se llevó hasta reflujo y se dejó la reacción durante una noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se lavó con Na₂CO₃ acuoso al 5% (2 x 50 ml), agua (50 ml), se secó (MgSO₄) y se purificó mediante cromatografía para dar 1,34 g (2,2 mmol, 53%) del cetal.

Formación del mesilato:

- 25 Se cargó un RBF de 250 ml con el γ -linolenil cetal (1,34 g, 2,19 mmol), TEA (1 ml, 7,1 mmol) y una barra de agitación. El matraz se descargó con nitrógeno, se añadió DCM anh. (10 ml), y la solución se enfrió a -15°C. En otro matraz de 50 ml, se preparó una solución de MsCl (342 μ l, 4,4 mmol, 2 equiv.) en DCM anhidro (15 ml), después se transfirió al vaso de reacción mediante una jeringuilla durante 20 minutos. La reacción se agitó durante 90 minutos a -15°C, tras lo cual el material de partida se había consumido. La mezcla de reacción se diluyó con 50 ml adicionales de DCM, se lavó con NaHCO₃ (2 x 50 ml), se secó (MgSO₄) y se purificó por cromatografía. Rendimiento final de 1,31 g, 1,90 mmol, 87%.

Síntesis de γ -DLen-C2K-DMA:

- 40 Se cargó un RBF de 250 ml con el mesilato (1,31 g, 1,9 mmol), isopropanol (10 ml) y una barra de agitación. El matraz se descargó con nitrógeno, se cerró herméticamente, y se añadió una solución 2,0 M de dimetilamina en metanol (60 ml) mediante una cánula. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La solución se concentró y purificó mediante cromatografía. Rendimiento final de 1,1 g, 1,72 mmol, 91%.

- 45 Se debe entender está previsto que la anterior descripción sea ilustrativa y no restrictiva. Muchas realizaciones serán evidentes para los expertos en la materia tras leer la descripción anterior.

LISTADO DE SECUENCIAS

50 <110> Protiva Biotherapeutics, Inc.

<120> Nuevas formulaciones de lípidos para el suministro de agentes terapéuticos a tumores sólidos

<130> N.115719
 <140> EP 10793484.6
 <141> 30/06/2010
 5 <150> US 61/222.469
 <151> 01/07/2009
 10 <150> US 61/295.134
 <151> 14/01/2010
 <160> 149
 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
 15 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-1
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(10)
 <223> u = um
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)...(14)
 <223> u = um
 35 <400> 1
 agaucacccu ccuaaaau u 21
 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-A
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(10)
 <223> u = um
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)...(18)
 <223> u = um
 55 <400> 2
 agaucacccu ccuaaaau u 21
 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-2
 65

- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(10)
<223> u = um
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (14)...(20)
<223> u = um
- 15 <400> 3
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 20 <210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-4
- 30 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(10)
<223> u = um
- 35 <220>
<221> base_modificada
<222> (14)...(21)
<223> u = um
- 40 <400> 4
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 45 <210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-5
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(20)
<223> u = um
- 60 <400> 5
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 65 <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 70 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-6
- 75 <220>
<221> base_modificada
<222> (2)...(2)
<223> g = gm

- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(10)
<223> u = um
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (14)...(20)
<223> u = um
- 15 <400> 6
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 20 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-7
- 30 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(21)
<223> u = um
- 35 <400> 7
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 40 <210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-8
- 50 <220>
<221> base_modificada
<222> (2)...(2)
<223> g = gm
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(10)
<223> u = um
- 60 <220>
<221> base_modificada
<222> (14)...(21)
<223> u = um
- 65 <400> 8
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 70 <210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 75 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante S-9

- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (2)...(2)
<223> g = gm
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(20)
<223> u = um
- 15 <400> 9
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 20 <210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<221> base_modificada
<222> (2)...(2)
<223> g = gm
- 30 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(21)
<223> u = um
- 35 <400> 10
agaucacccu ccuuaauau u 21
- 40 <210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 45 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-A
- 50 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(8)
<223> g = gm
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um
- 60 <400> 11
uauuuagga gggugaucuu u 21
- 65 <210> 12
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-B

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)...(9)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

20 <400> 12
 uauuuuagga gggugaucuu u 21

<210> 13
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-C

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)...(5)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)...(11)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)...(17)
 <223> u = um

45 <400> 13
 uauuuuagga gggugaucuu u 21

<210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-D

55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

65

<400> 14

ES 2 613 498 T3

uauuuuagga gggugaucuu c 21

5 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-E

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

30 <400> 15
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

35 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-F

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

65 <400> 16
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 17
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 613 498 T3

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-G

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (9)...(9)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

20 <400> 17
 uauuuuagga gggugaucuu u 21

<210> 18
 <211> 21

25 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-H

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

50 <400> 18
 uauuuuagga gggugaucuu u 21

55 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-1

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)

<223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 <400> 19
 20 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-2
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 45 <400> 20
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 21
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-3
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 60 <223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 65 <223> g = gm

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 15

<400> 21
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-4
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 50

<400> 22
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 55

<210> 23
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-5
 65

<220>
 <221> base_modificada

<222> (1)...(1)
 <223> u = um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

25 <400> 23
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

30 <210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-6

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

55 <400> 24
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

60 <210> 25
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-7

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

25 <400> 25
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-8

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

60 <400> 26
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 27
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-9

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

30 <400> 27
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 28
 <211> 21

35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-10

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

<400> 28
uauuuuagga gggugaucuu c 21

5 <210> 29
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-11

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)...(1)
<223> u = um

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(4)
<223> u = um

25 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(8)
<223> g = gm

30 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm

35 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um

40 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um

45 <400> 29
uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 30
<211> 21
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-12

55 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)...(1)
<223> u = um

60 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(8)
<223> g = gm

65 <220>

<221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

10

<400> 30
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 31
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-13

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

45

<400> 31
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50

<210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-14

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

65

<220>
 <221> base_modificada

<222> (8)...(8)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

15 <400> 32
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21

20 <210> 33
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-15

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

50 <400> 33
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21

55 <210> 34
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-16

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (13)...(15)
<223> g = gm
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um
- 15 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um
- 20 <400> 34
uauuuuagga gggugaucuu c 21
- <210> 35
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-17
- 30 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)...(1)
<223> u = um
- 35 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(4)
<223> u = um
- 40 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(8)
<223> g = gm
- 45 <220>
<221> base_modificada
<222> (13)...(15)
<223> g = gm
- 50 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um
- 60 <400> 35
uauuuuagga gggugaucuu c 21
- <210> 36
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-18

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

25 <400> 36
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

 <210> 37
 <211> 21

30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-A

35 <400> 37
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

40 <210> 38
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-20

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)

<223> u = um

<400> 38
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

5

<210> 39
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-21

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

35

<400> 39
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 40
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-22

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

65

ES 2 613 498 T3

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 5
 <400> 40
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 41
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-23
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 35
 <400> 41
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 40
 <210> 42
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-24
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 65
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (15)...(15)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

10 <400> 42
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

15 <210> 43
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-25

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

45 <400> 43
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-26

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

70 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

15 <400> 44
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

20 <210> 45
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-27

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

50 <400> 45
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55 <210> 46
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-28

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

65 <220>

<221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

15

<400> 46
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 47
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-29

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

45

<400> 47
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50

<210> 48
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-30

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)

<223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 <400> 48
 15 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-31
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 45 <400> 49
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 50
 <211> 21
 50 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-32
 55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 60 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 65 <223> g = gm

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 10

<400> 50
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-33
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 45

<400> 51
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 50

<210> 52
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-34
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 65

<220>
 <221> base_modificada

<222> (12)...(12)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

20 <400> 52
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

25 <210> 53
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-35

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

60 <400> 53
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

60 <210> 54
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-36

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

30 <400> 54
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

35 <210> 55
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

65 <400> 55
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 56
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-38
 10
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 25
 <400> 56
 uuuuuagga gggugaucu c 21
 <210> 57
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-39
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 45
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 65

ES 2 613 498 T3

<400> 57
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

5 <210> 58
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-40

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

45 <400> 58
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50 <210> 59
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-41

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (12)...(12)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

20 <400> 59
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

25 <210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-42

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

<400> 60
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55 <210> 61
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-43

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(12)
<223> g = gm
- 15 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm
- 20 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um
- 25 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um
- 30 <400> 61
uauuuuagga gggugaucuu c 21
- <210> 62
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 35 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-44
- 40 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)...(3)
<223> u = um
- 45 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm
- 50 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(12)
<223> g = gm
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm
- 60 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um
- 65 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)

ES 2 613 498 T3

<223> u = um

<400> 62
uauuuuagga gggugaucuu c 21

5

<210> 63
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-45

15

<220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(4)
<223> u = um

20

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

25

<220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(12)
<223> g = gm

30

<220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm

35

<220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um

40

<220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um

45

<400> 63
uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 64
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50

<220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-46

55

<220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

60

<220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(12)
<223> g = gm

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 10

<400> 64
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 65
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-47
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 45

<400> 65
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 50

<210> 66
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-48
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 65

<220>
 <221> base_modificada

<222> (4)...(4)
 <223> u = um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

25 <400> 66
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

30 <210> 67
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-49

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

60 <400> 67
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

65 <210> 68
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-50

5 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)...(4)
<223> u = um

10 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um

25 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um

30 <400> 68
uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 69
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-51

40 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)...(3)
<223> u = um

45 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

50 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm

55 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(20)
<223> u = um

60 <400> 69
uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 70
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

65

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-52

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

25 <400> 70
 uauuuagga gggugaucu c 21

<210> 71
 <211> 21

30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-53

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

<400> 71
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

5 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-54

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

50 <400> 72
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55 <210> 73
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-55

65 <220>
 <221> base_modificada

<222> (8)...(8)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

20 <400> 73
 uauuuagga gggugaucuu c 21

25 <210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-56

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

60 <400> 74
 uauuuagga gggugaucuu c 21

65 <210> 75
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 5 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-57

<220>
 10 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

<220>
 15 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

<220>
 20 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

<220>
 25 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

<400> 75
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

30 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-58

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

60 <400> 76
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

65 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-59

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

35 <400> 77
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 78
 <211> 21

40 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-60

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 15

<400> 78
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 79
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-61
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 50

<400> 79
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 55

<210> 80
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-62
 65

<220>
 <221> base_modificada

<222> (3)...(4)
 <223> u = um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

30 <400> 80
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

35 <210> 81
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-63

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

<400> 81

ES 2 613 498 T3

uauuuuagga gggugaucuu c 21

5 <210> 82
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-64

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

40 <400> 82
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

40 <210> 83
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-65

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)

<223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 <400> 83
 10 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 84
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-66
 20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 40 <400> 84
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 85
 <211> 21
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 50 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-67
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 55 <223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 60 <223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 65 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

15 <400> 85
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

20 <210> 86
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-68

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

50 <400> 86
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55 <210> 87
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-69

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

65 <220>
 <221> base_modificada

ES 2 613 498 T3

<222> (12)...(12)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

20 <400> 87
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

25 <210> 88
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-70

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> u = um

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

60 <400> 88
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

65 <210> 89
 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 5 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-71

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 30

<400> 89
 uauuuagga gggugaucu c 21
 35

<210> 90
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 40 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-72

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 65

<223> u = um
 <400> 90
 uuuuuagga gggugaucuu c 21
 5
 <210> 91
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-73
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 35
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 40
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 45
 <400> 91
 uuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 92
 <211> 21
 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-74
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 15

<400> 92
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 93
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-75

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 55

<400> 93
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 60

<210> 94
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 65

ES 2 613 498 T3

<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-76

5 <220>
<221> base_modificada
<222> (3)...(4)
<223> u = um

10 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(12)
<223> g = gm

20 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm

25 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(20)
<223> u = um

30 <400> 94
uauuuagga gggugaucuu c 21

35 <210> 95
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-77

45 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)...(4)
<223> u = um

50 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

55 <220>
<221> base_modificada
<222> (15)...(15)
<223> g = gm

60 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(20)
<223> u = um

65 <400> 95
uauuuagga gggugaucuu c 21

<210> 96
<211> 21
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 5 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-78

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 30

<400> 96
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 35

<210> 97
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 40 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-79

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm
 55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 65

<223> u = um

<400> 97
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

5

<210> 98
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-80

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(12)
 <223> g = gm

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (15)...(15)
 <223> g = gm

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

40

<400> 98
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

45

<210> 99
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-81

55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

ES 2 613 498 T3

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 5
 <400> 99
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 100
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-82
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 35
 <400> 100
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 40
 <210> 101
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-83
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm
 65
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (17)...(17)
 <223> u = um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

10 <400> 101
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

15 <210> 102
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-84

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

<400> 102
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50 <210> 103
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-85

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

ES 2 613 498 T3

5 <220>
<221> base_modificada
<222> (13)...(15)
<223> g = gm

10 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um

15 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um

20 <400> 103
uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 104
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-86

30 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm

35 <220>
<221> base_modificada
<222> (13)...(15)
<223> g = gm

40 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(20)
<223> u = um

45 <400> 104
uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 105
<211> 21
<212> ADN
50 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-87

55 <220>
<221> base_modificada
<222> (1)...(1)
<223> u = um

60 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(8)
<223> g = gm

65 <220>

<221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

15

<400> 105
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 106
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-88

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

50

<400> 106
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55

<210> 107
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-89

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)

<223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 20 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 <400> 107
 25 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 108
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 30
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-90
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 50 <400> 108
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 109
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-91
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 65 <223> u = um

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 20

<400> 109
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 110
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-92
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 55

<400> 110
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 60

<210> 111
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>

ES 2 613 498 T3

<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-93

- 5 <220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(4)
<223> u = um
- 10 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm
- 15 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(15)
<223> g, = gm
- 20 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(17)
<223> u = um
- 25 <220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um
- 30 <400> 111
uauuuuagga gggugaucuu c 21
- 35 <210> 112
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-94
- 45 <220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm
- 50 <220>
<221> base_modificada
<222> (12)...(15)
<223> g = gm
- 55 <220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(20)
<223> u = um
- 60 <400> 112
uauuuuagga gggugaucuu c 21
- 65 <210> 113
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 65 <220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-95

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

30 <400> 113
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

30 <210> 114
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-96

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)

<223> u = um

<400> 114
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

5

<210> 115
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-97

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

35

<400> 115
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 116
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-98

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

65

ES 2 613 498 T3

<220>
<221> base_modificada
<222> (20)...(20)
<223> u = um
5
<400> 116
uauuuuagga gggugaucuu c 21
10
<210> 117
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
15
<220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-99
20
<220>
<221> base_modificada
<222> (3)...(3)
<223> u = um
25
<220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm
30
<220>
<221> base_modificada
<222> (13)...(15)
<223> g = gm
35
<220>
<221> base_modificada
<222> (17)...(20)
<223> u = um
40
<400> 117
uauuuuagga gggugaucuu c 21
45
<210> 118
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
50
<220>
<223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-100
55
<220>
<221> base_modificada
<222> (4)...(4)
<223> u = um
60
<220>
<221> base_modificada
<222> (8)...(9)
<223> g = gm
65
<220>
<221> base_modificada
<222> (13)...(15)
<223> g = gm
70
<220>
<221> base_modificada

<222> (17)...(20)
 <223> u = um

5 <400> 118
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 119
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 15 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-101

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 40

<400> 119
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 120
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 50 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-102

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 65

ES 2 613 498 T3

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

20 <400> 120
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 121
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-103

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

50 <400> 121
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 122
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-104

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

65 <220>

<221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

20

<400> 122
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 123
 <211> 21

25

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-105

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

50

<400> 123
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55

<210> 124
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-106

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)

<223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 <400> 124
 20 uauuuuagga gggugaucuuc 21
 <210> 125
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-107
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 55 <400> 125
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 126
 <211> 21
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 65 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-108

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um
 30

<400> 126
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 127
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-109
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um
 45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 60

<400> 127
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 65

<210> 128

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-110

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

35 <400> 128
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

40 <210> 129
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-111

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(3)
 <223> u = um

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

<400> 129

ES 2 613 498 T3

uauuuuagga gggugaucuu c 21

5 <210> 130
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-112

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

uauuuuagga gggugaucuu c 21

35 <210> 131
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-113

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um

50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

55 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)

<223> u = um

<400> 131
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

5

<210> 132
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-114

15

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

20

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

35

<400> 132
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 133
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-115

45

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

50

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

55

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm

65

ES 2 613 498 T3

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 5
 <400> 133
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 <210> 134
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-116
 15
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um
 20
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 25
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm
 30
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 35
 <400> 134
 uauuuuagga gggugaucuu c 21
 40
 <210> 135
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-117
 50
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um
 55
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 60
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 65
 <220>
 <221> base_modificada

<222> (17)...(17)
 <223> u = um

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

10 <400> 135
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

15 <210> 136
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-118

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

<400> 136
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50 <210> 137
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-119

60 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

15 <400> 137
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

20 <210> 138
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-120

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

50 <400> 138
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

55 <210> 139
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-121

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um

65 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

65 <220>

<221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(17)
 <223> u = um

10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (20)...(20)
 <223> u = um

15

<400> 139
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 140
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-122

25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(3)
 <223> u = um

30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm

35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

45

<400> 140
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

50

<210> 141
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-123

60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(1)
 <223> u = um

65

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)...(4)

<223> u = um
 <220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 <220>
 <221> base_modificada
 15 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 <400> 141
 20 uauuuagga gggugaucu c 21
 <210> 142
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-124
 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)...(4)
 <223> u = um
 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 50 <400> 142
 uauuuagga gggugaucu c 21
 <210> 143
 <211> 21
 55 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de
 60 interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-125
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 65 <223> u = um

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(9)
 <223> g = gm
 5

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)...(15)
 <223> g = gm
 10

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 15

<400> 143
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21

<210> 144
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-126
 25

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um
 30

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)...(8)
 <223> g = gm
 35

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm
 40

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um
 45

<400> 144
 uuuuuuagga gggugaucuu c 21
 50

<210> 145
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

<220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante AS-127
 60

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (1)...(4)
 <223> u = um
 65

<220>
 <221> base_modificada

<222> (8)...(9)
 <223> g = gm

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)...(15)
 <223> g = gm

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)...(20)
 <223> u = um

15 <400> 145
 uauuuuagga gggugaucuu c 21

20 <210> 146
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante

<400> 146
 uauuuuagga gggugaucu 19

30 <210> 147
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante

40 <400> 147
 agaucacccu ccuuuuuu 19

45 <210> 148
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra codificante

<400> 148
 agaccuaccu ccggaucauu u 21

55 <210> 149
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> cinasa 1 similar a polo (PLK-1) sintética, serina/treonina proteína cinasa 13 (STPK13) ARN pequeño de interferencia (ARNpi) hebra no codificante

<400> 149
 uugaucggga gguaggucuu u 21

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

- 5 (a) un ARNpi que silencia la expresión génica de la cinasa 1 similar a polo (PLK-1), que consiste en una secuencia de hebra no codificante 5'-UAUUUAAGGAGGGUGAUCUUC-3' y una secuencia de hebra codificante 5'-AGAUCACCCUCCUAAAUAUU-3', en la que los nucleótidos en negrita y subrayados son nucleótidos de 2'OMe;
- 10 (b) un lípido catiónico que comprende de un 50 % en moles a un 65 % en moles del lípido total presente en la partícula;
- (c) un lípido no catiónico que comprende del 25 % en moles al 45 % en moles del lípido total presente en la partícula; y
- (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas que comprende del 5 % en moles al 10 % en moles del lípido total presente en la partícula.

15 2. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula de ácido nucleico-lípido.

20 3. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1 o 2, en la que:

- (I) el lípido catiónico comprende 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- γ -linoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (γ -DLenDMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), o una mezcla de los mismos; y/o
- 25 (II) el lípido catiónico comprende de un 50 % en moles a un 60 % en moles del lípido total presente en la partícula.

4. La partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que:

- 30 (I) el lípido no catiónico es un fosfolípido;
- el lípido no catiónico comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol, preferentemente en la que el fosfolípido comprende de un 5 % en moles a un 10 % en moles del lípido total presente en la partícula o el colesterol comprende de un 25 % en moles a un 35 % en moles del lípido total presente en la partícula, opcionalmente en la que el fosfolípido de (I) o (II) se selecciona entre el grupo que
- 35 consiste en dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), y una mezcla de los mismos;
- (III) el lípido no catiónico es una mezcla de DPPC y colesterol; o
- (IV) el lípido no catiónico es colesterol o un derivado de colesterol, opcionalmente en el que el colesterol comprende de un 30 % en moles a un 40 % en moles del lípido total presente en la partícula.

40 5. La partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que:

- (I) el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido; y/o
- 45 (II) el lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas comprende de un 6 % en moles a un 8 % en moles del lípido total presente en la partícula.

6. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 5, en la que:

- (a) el PEG tiene un peso molecular promedio de 550 Dalton a 1000 Dalton;
- 50 (b) el PEG tiene un peso molecular promedio de 750 Dalton;
- (c) el conjugado de PEG-lípido es un miembro seleccionado entre el grupo que consiste en un conjugado de PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado de PEG-dialquioxipropilo (PEG-DAA), un conjugado de PEG-fosfolípido, un conjugado de PEG-ceramida (PEG-Cer), y una mezcla de los mismos, opcionalmente en el que el conjugado PEG-DAA comprende un conjugado de PEG-dimiristoiloxipropilo (PEG-DMA);
- 55 (d) la partícula de ácido nucleico-lípido comprende un 54 % en moles de lípido catiónico, un 7 % en moles de fosfolípido, un 32 % en moles de colesterol o un derivado del mismo, y un 7 % en moles de conjugado de PEG-lípido; o
- (e) la partícula de ácido nucleico-lípido comprende un 58 % en moles de lípido catiónico, un 35 % en moles de colesterol o un derivado del mismo, y un 7 % en moles de conjugado de PEG-lípido.
- 60

7. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las realizaciones anteriores y un portador farmacéuticamente aceptable.

65 8. Un método para introducir un ácido nucleico en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula *in vitro* con una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

9. Una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en:

(a) un método para el suministro *in vivo* de un ácido nucleico a un tumor sólido, comprendiendo el método administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un mamífero; o

5 (b) un método para tratar un trastorno de la proliferación celular, tal como el cáncer, en un mamífero que lo necesite, opcionalmente un ser humano, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha partícula de ácido nucleico-lípido.

10. La partícula de ácido nucleico-lípido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9(a), en la que:

10

(I) la partícula se administra por una ruta sistémica;

(II) el ácido nucleico se suministra preferentemente al tumor sólido en comparación con otros tejidos;

(III) el tumor sólido es un tumor hepático o un tumor ubicado fuera del hígado;

(IV) la partícula reduce el tamaño y/o el volumen del tumor sólido; o

15

(V) el mamífero es un ser humano.

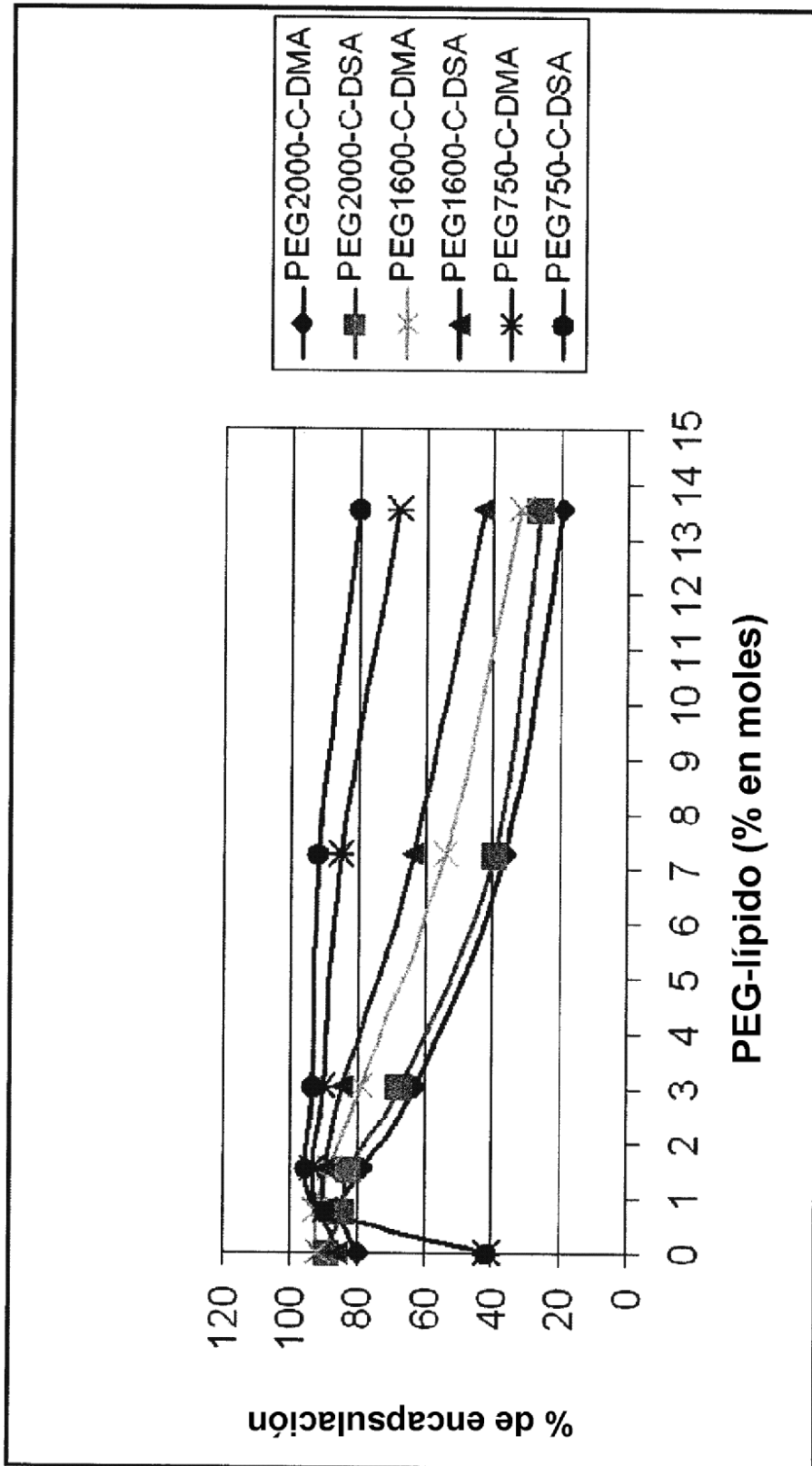


FIG. 1

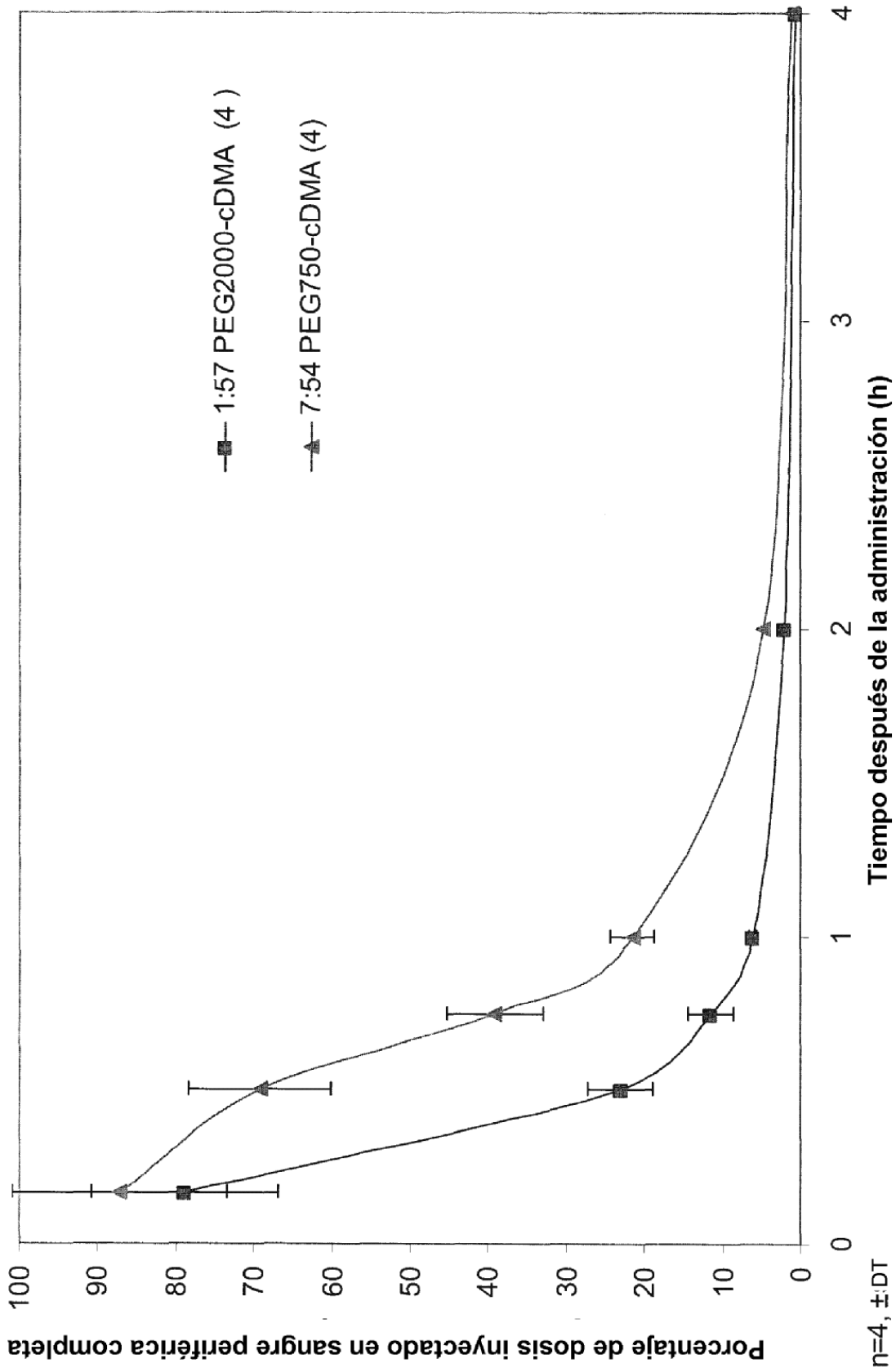


FIG. 2

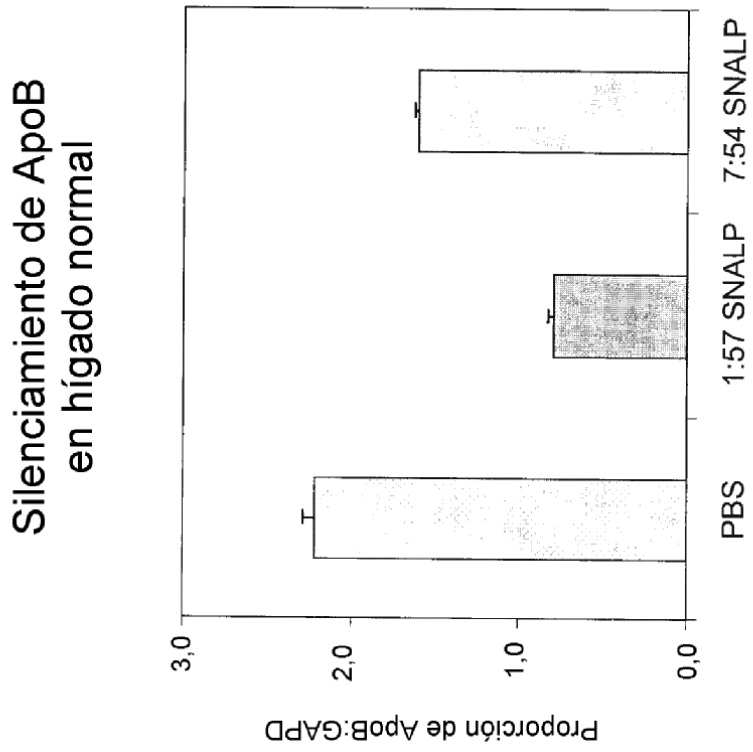
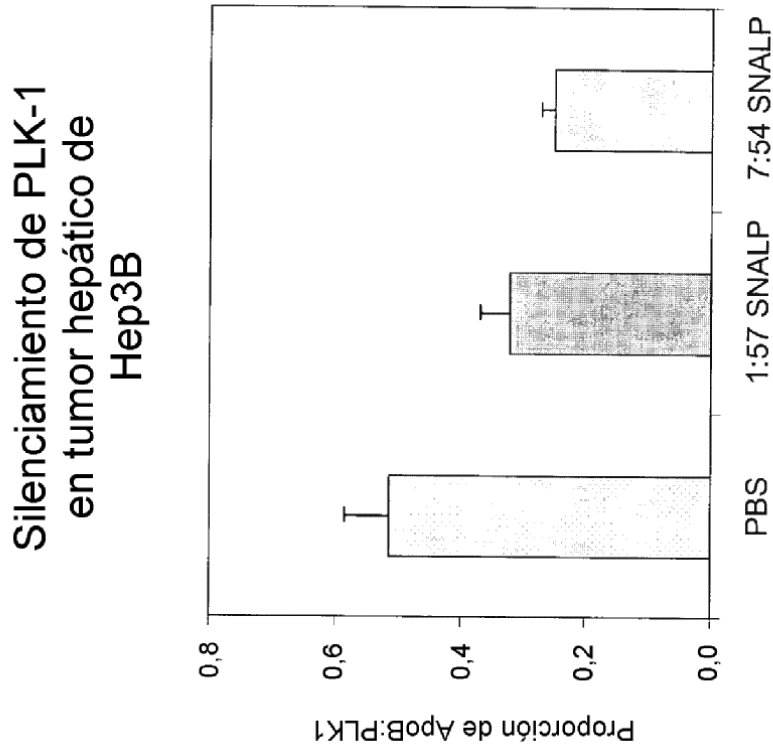


FIG. 3

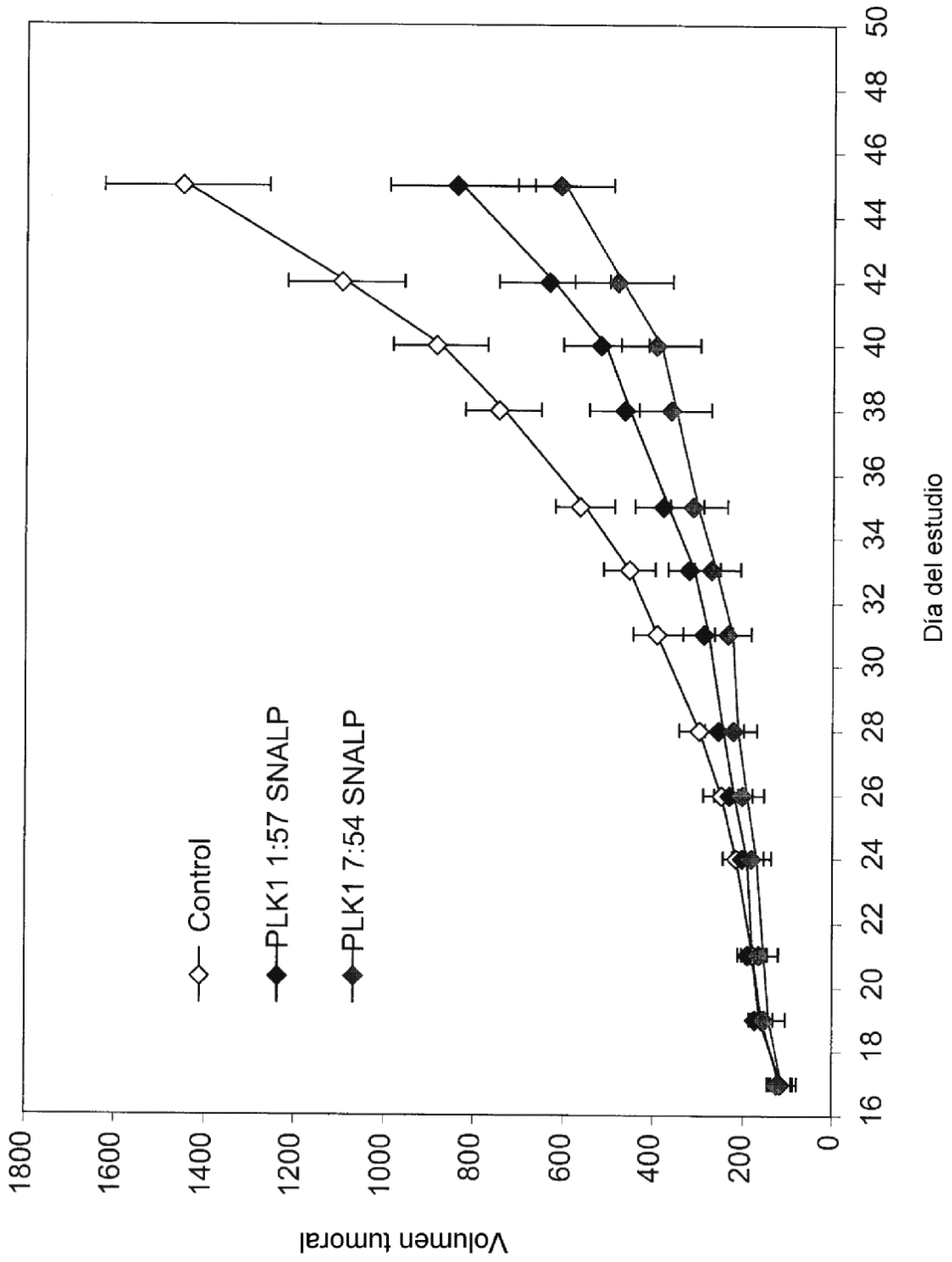


FIG. 4

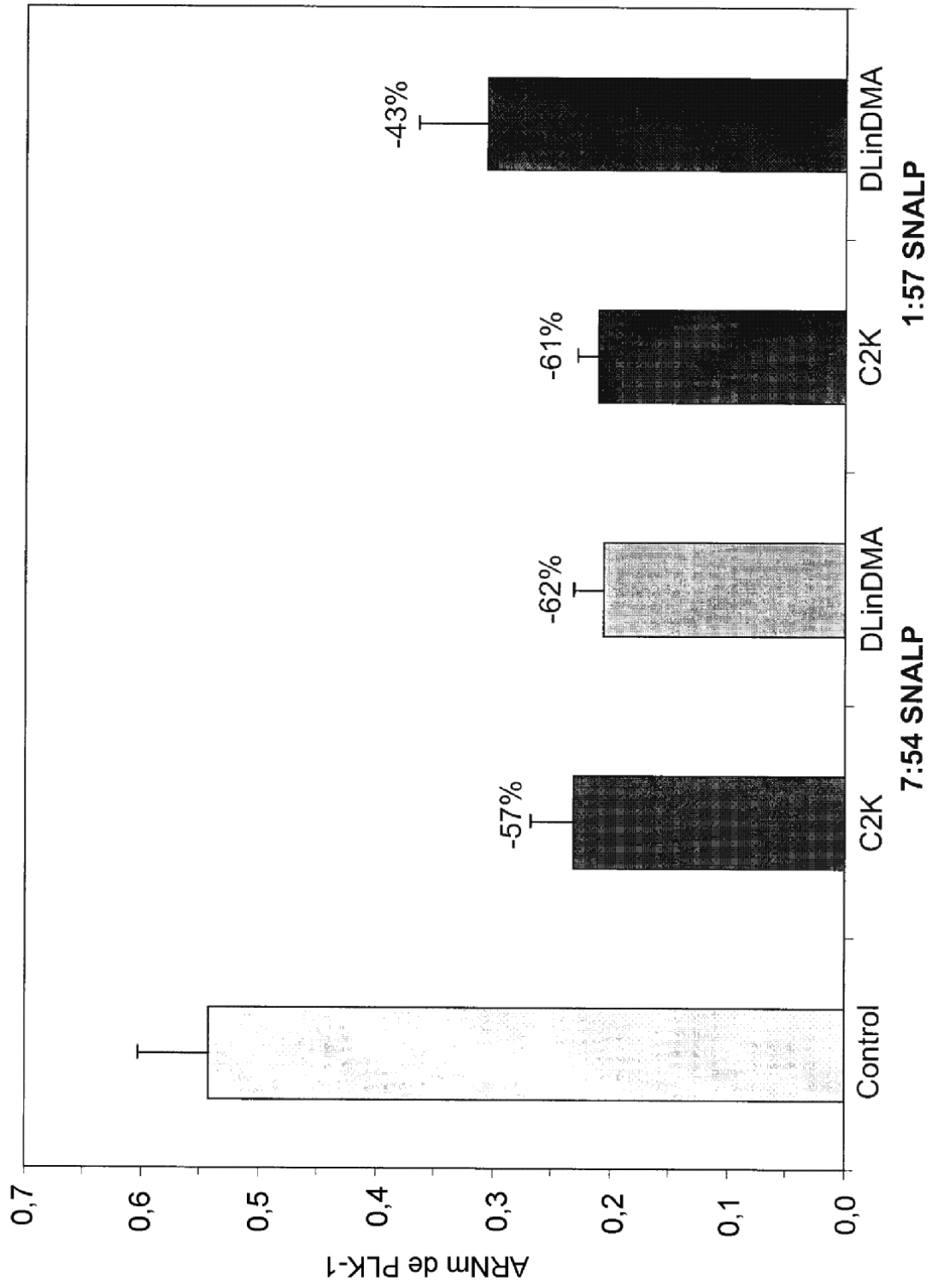


FIG. 5

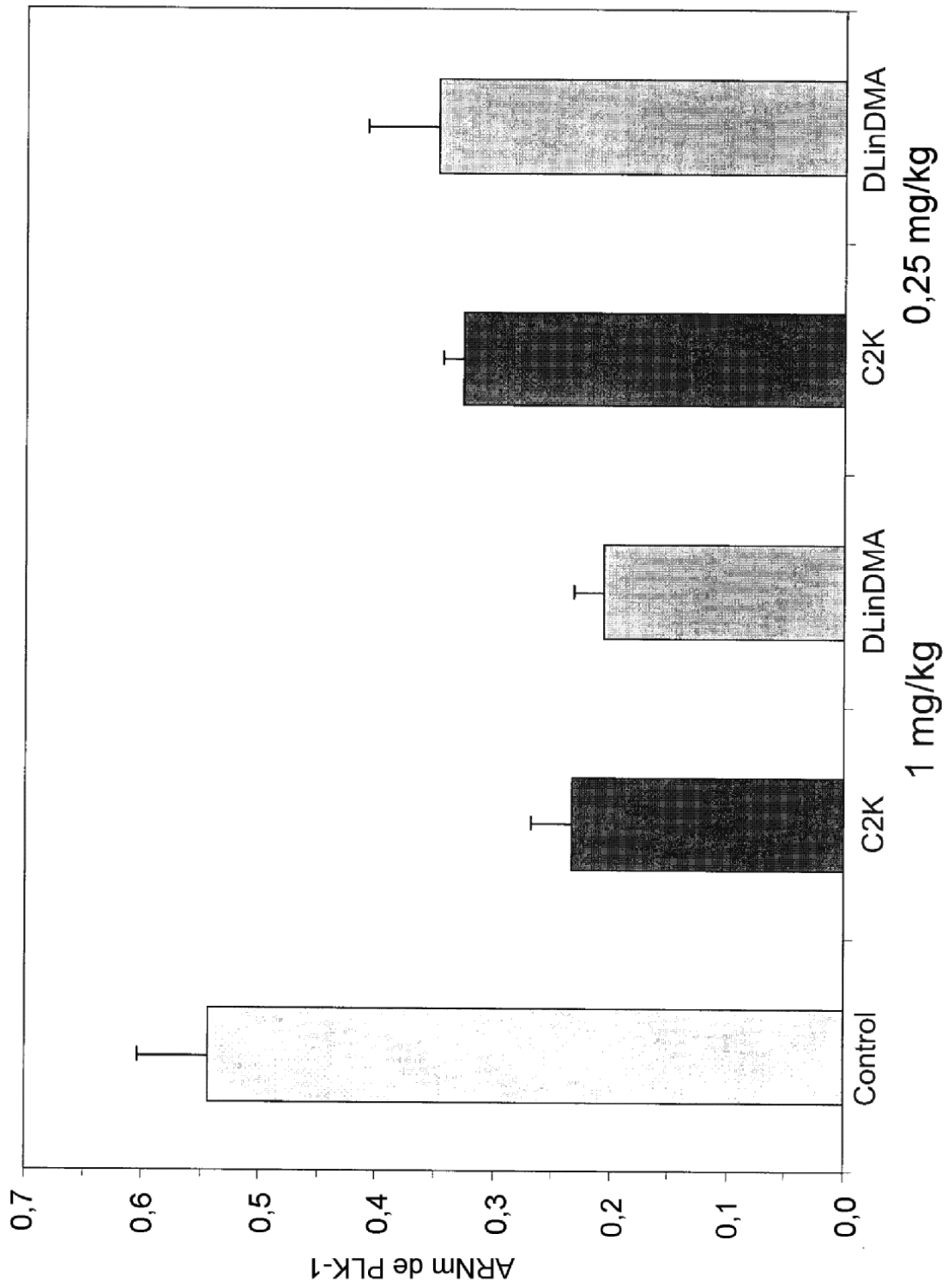


FIG. 6

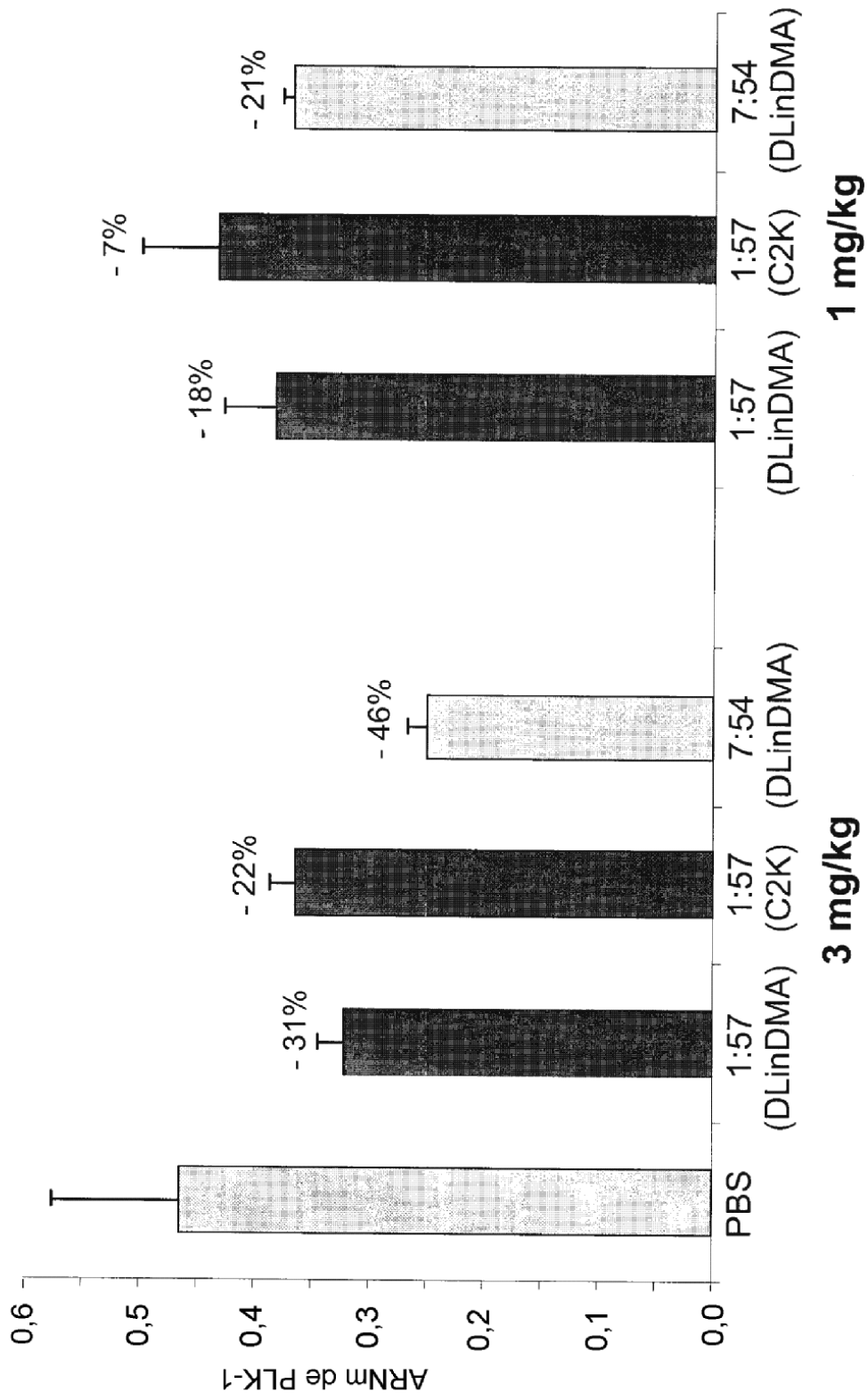


FIG. 7

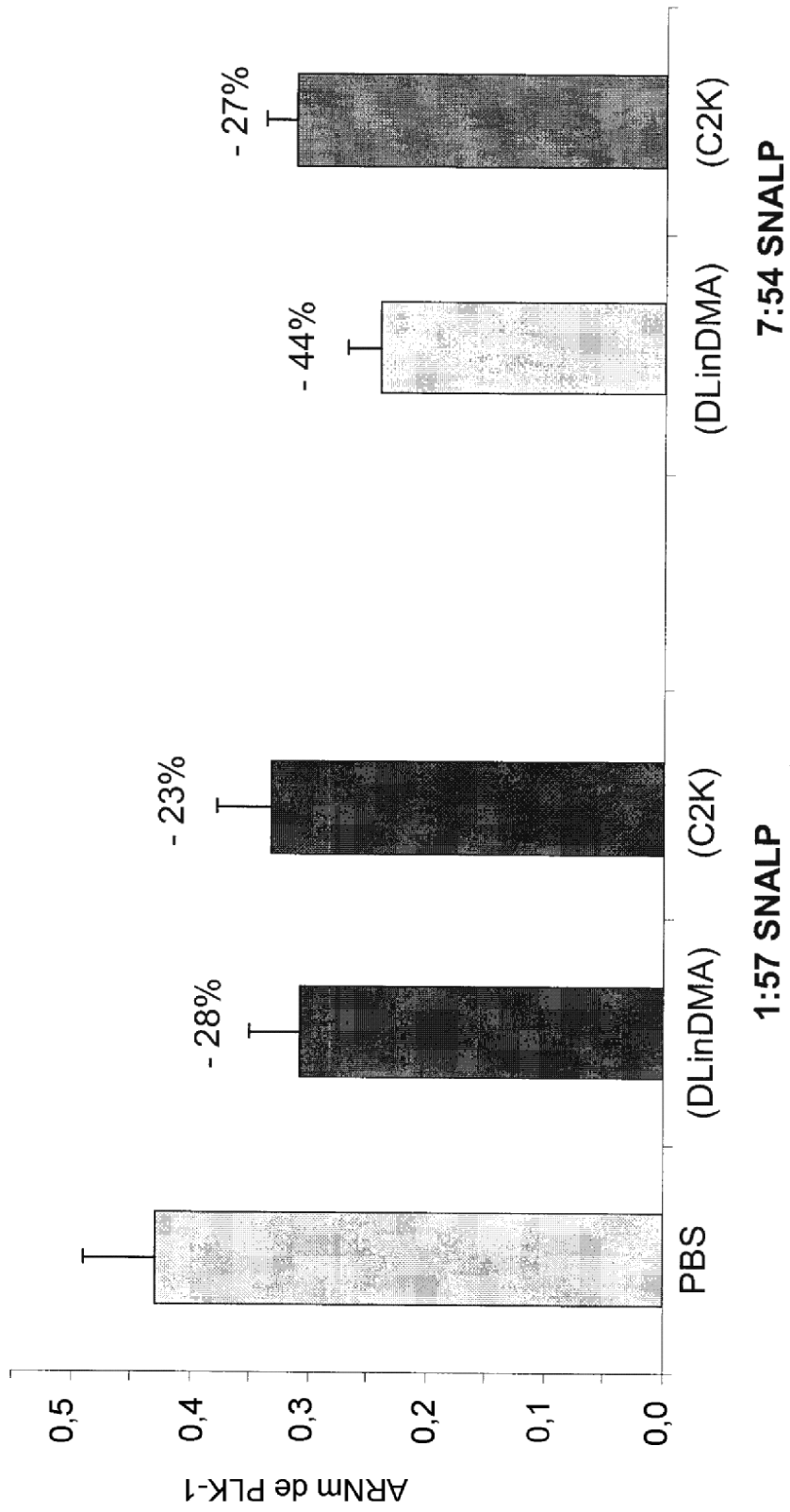
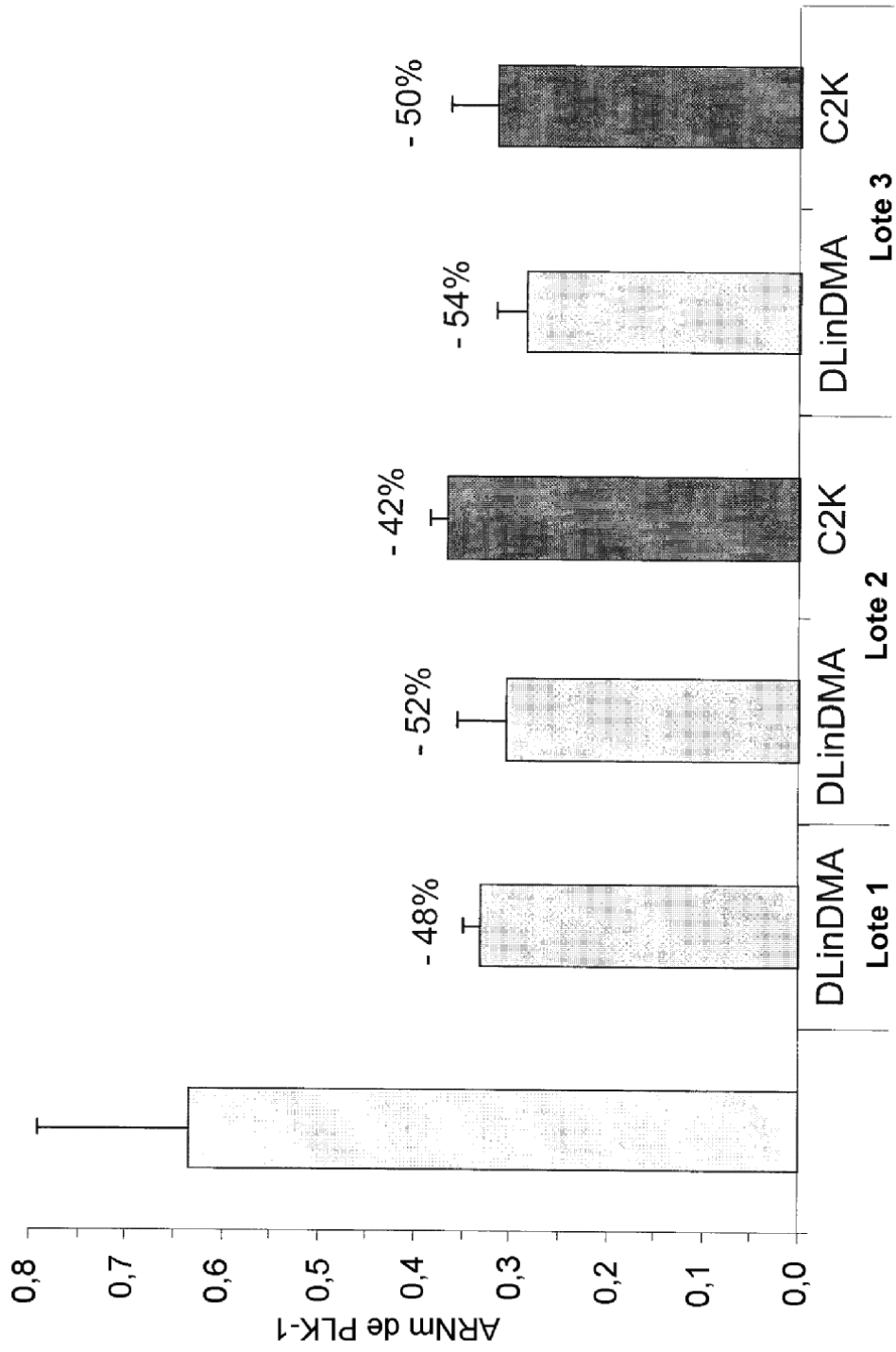


FIG. 8



7:54 SNALP

FIG. 9

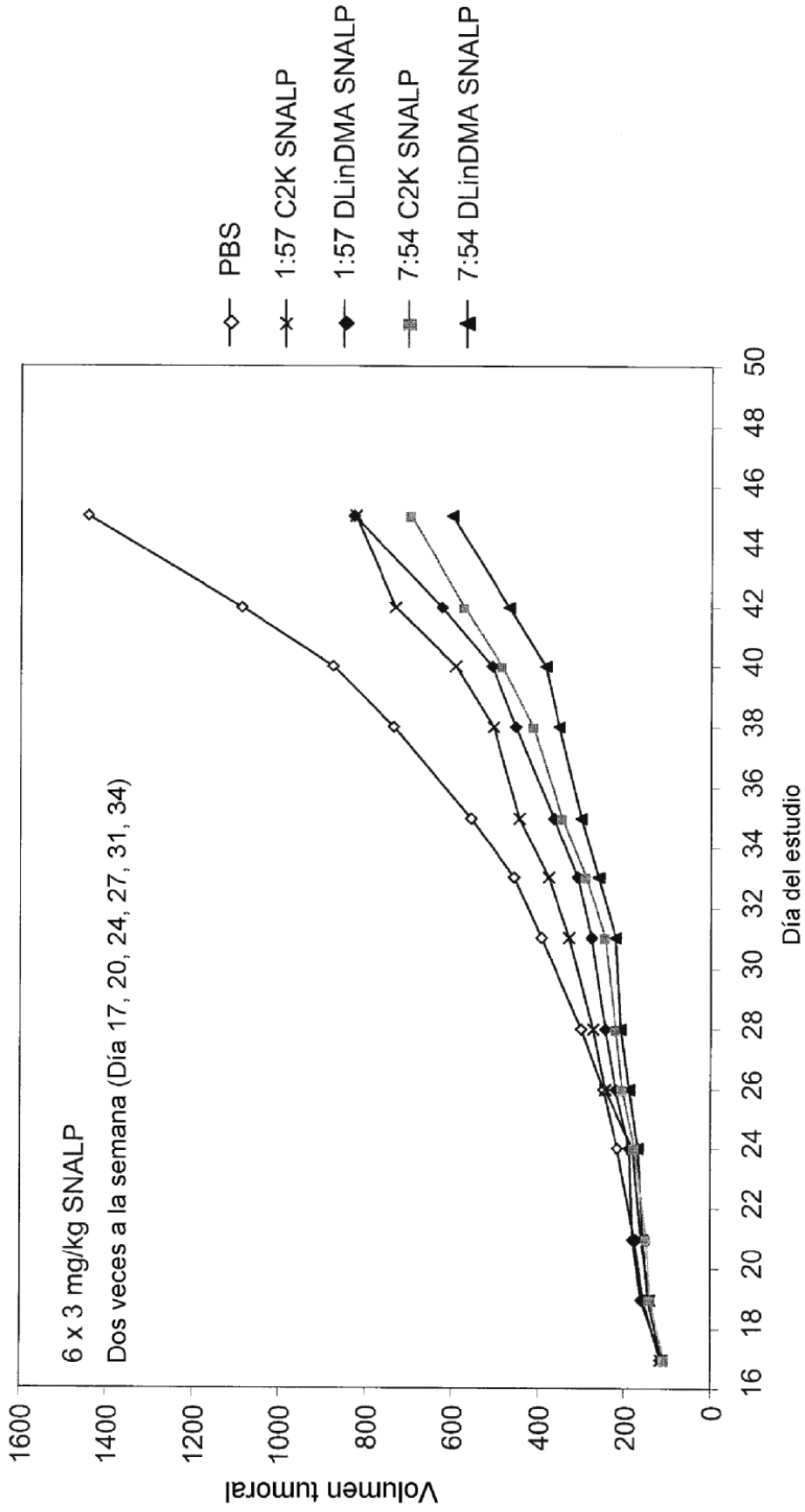


FIG. 10

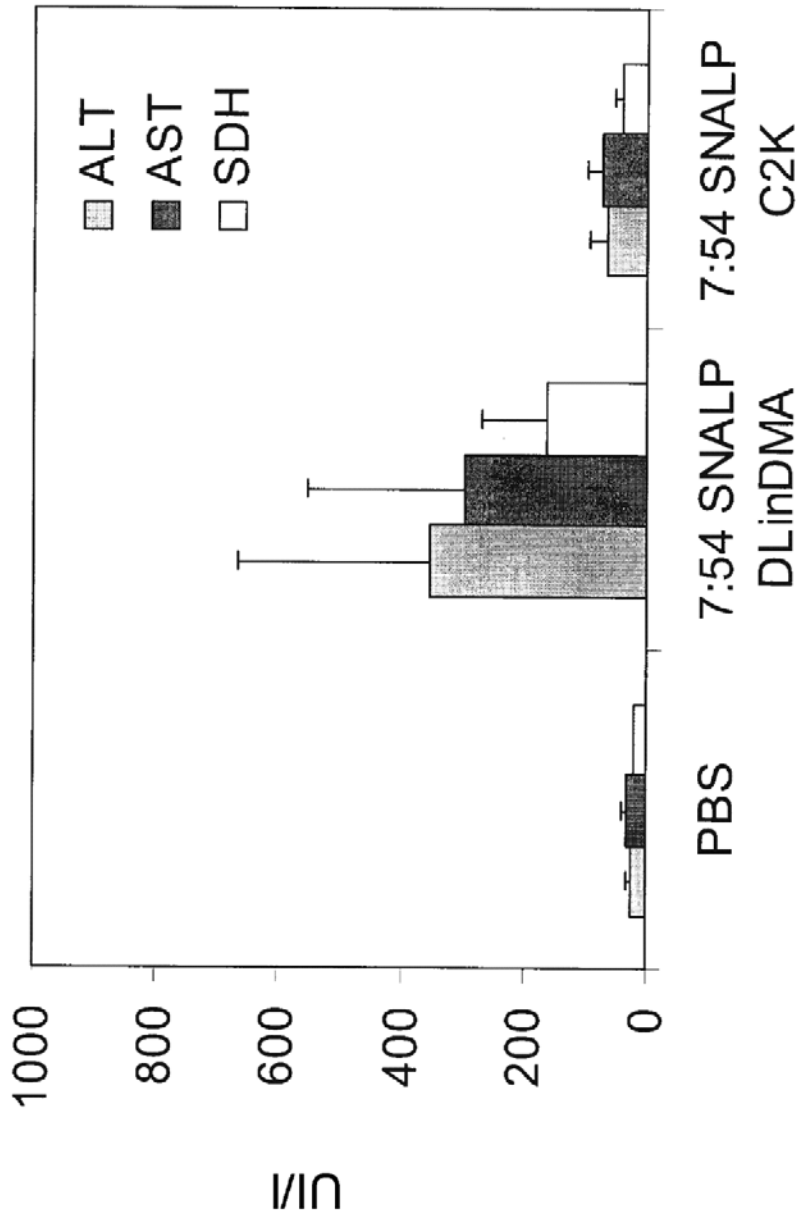


FIG. 11

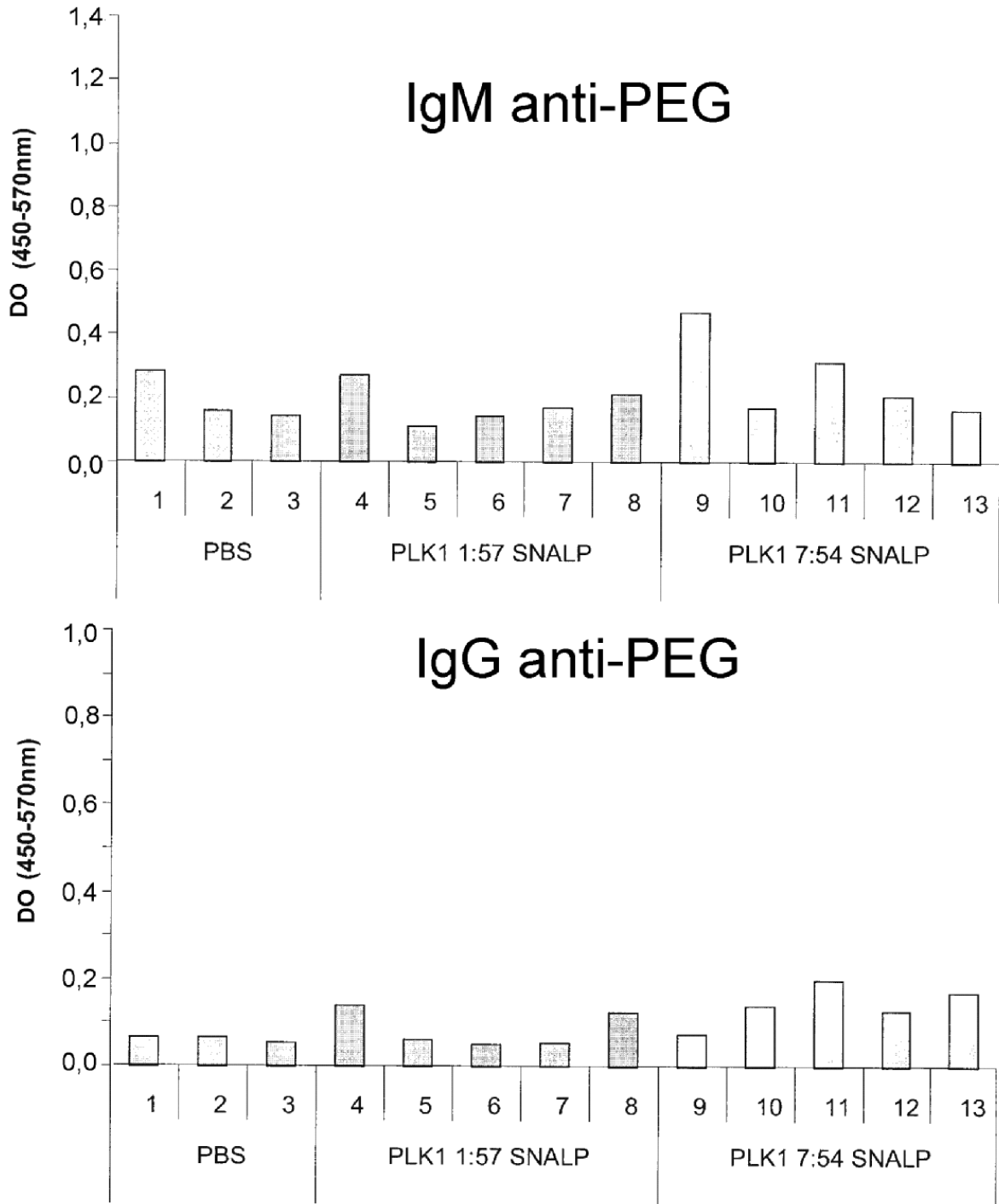


FIG. 12

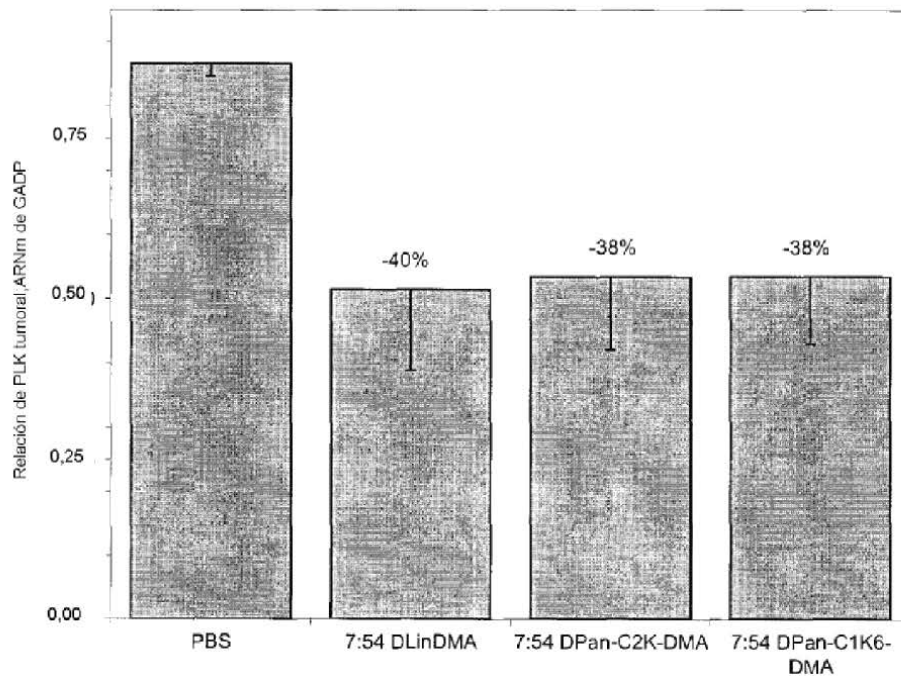
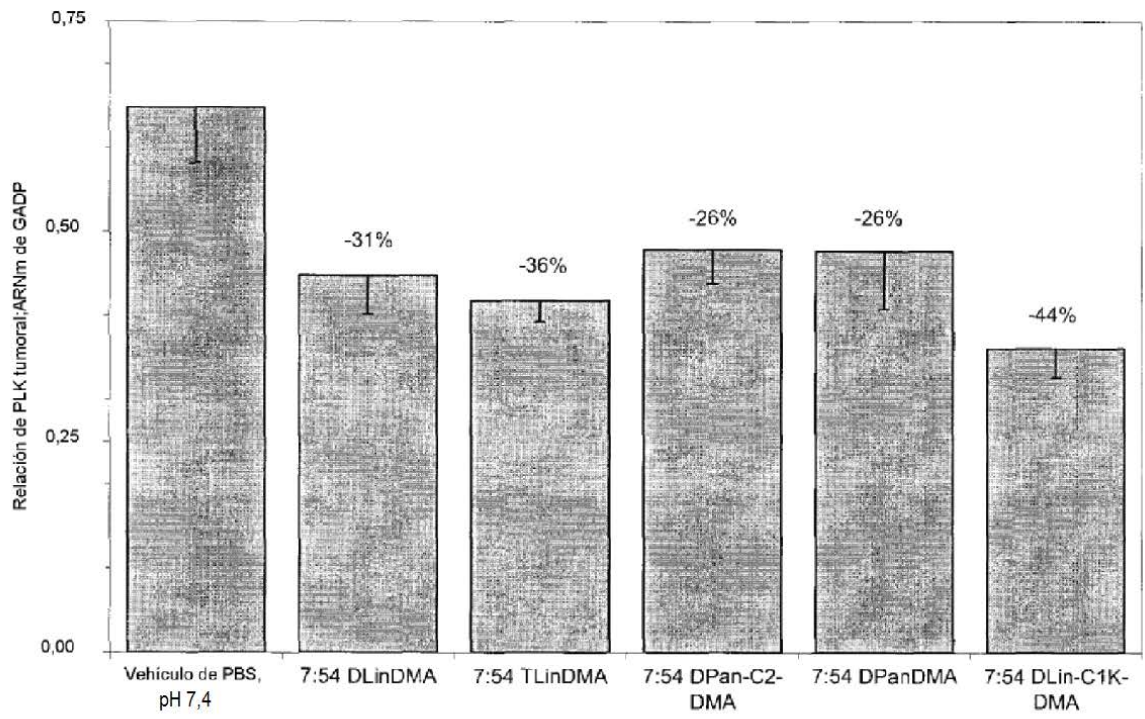


FIG. 13