

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 448**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/88 (2006.01)

A61K 31/712 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61K 9/127 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.04.2009** **PCT/CA2009/000496**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2009** **WO09127060**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.04.2009** **E 09731866 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017** **EP 2279254**

54 Título: **Novedosas formulaciones de lípidos para la administración de ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

15.04.2008 US 45228 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MACLACHLAN, IAN;
YAWORSKI, EDWARD;
LAM, KIEU;
JEFFS, LLOYD B. y
PALMER, LORNE R.

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 638 448 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

Novedosas formulaciones de lípidos para la administración de ácidos nucleicos

5 Antecedentes de la invención

La interferencia por ARN (iARN) es un proceso evolutivamente conservado en el que el reconocimiento de ARN bicatenario (ARNbc) conduce por último lugar a la supresión postranscripcional de la expresión génica. Esta supresión está mediada por ARNbc corto, también llamado ARN interferente pequeño (ARNip), que induce degradación específica de ARNm mediante apareamiento de bases complementarias. En varios sistemas modelo, esta respuesta natural se ha desarrollado en una poderosa 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)). Más recientemente, se descubrió que la introducción de dúplex de ARNbc de 21 nucleótidos sintéticos en células de mamífero podría silenciar eficientemente la expresión génica.

Aunque el mecanismo preciso no está todavía claro, la iARN proporciona un posible nuevo enfoque para regular por disminución o silenciar la transcripción y traducción de un gen de interés. Por ejemplo, se desea modular (por ejemplo, reducir) la expresión de ciertos genes para el tratamiento de trastornos neoplásicos tales como el cáncer. También se desea silenciar la expresión de genes asociados a enfermedades y trastornos del hígado tales como hepatitis. Se desea además reducir la expresión de ciertos genes para el tratamiento de aterosclerosis y sus manifestaciones, por ejemplo, hipercolesterolemia, infarto de miocardio y trombosis.

Se requiere un sistema de administración de ácidos nucleicos seguro y eficaz para que la iARN sea terapéuticamente útil. Los vectores víricos son sistemas de administración génica relativamente eficientes, pero padecen una variedad de limitaciones, tales como potencial de inversión a los problemas de respuesta no mutante, además de inmunitaria. Como resultado, los sistemas de administración génica 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)). Además, los sistemas víricos son rápidamente eliminados de la circulación, limitando la transfección a órganos de "primer paso" tales como los pulmones, hígado y bazo. Además, estos sistemas inducen respuestas inmunitarias que comprometen la administración con inyecciones posteriores.

Los complejos de ADN de plásmido-liposoma catiónico son actualmente los vehículos de administración génica no vírica más comúnmente empleados (Feigner, *Scientific American*, 276:102 (1997); Chonn et al., *Current Opinion in Biotechnology*, 6:698 (1995)). Por ejemplo, los complejos de liposoma catiónico hechos de un compuesto anfipático, un lípido neutro y un detergente para transfectar células de insecto se desvelan en la patente de EE.UU. N.º 6.458.382. También se desvelan complejos de liposoma catiónico en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20030073640.

Los complejos de liposoma catiónico son sistemas grandes poco definidos que no son aptos 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 agregados grandes, positivamente cargados, los lipoplejos son rápidamente eliminados cuando se administran *in vivo*, con los niveles de expresión más altos observados en los órganos de primer paso, particularmente los pulmones (Huang et al., *Nature Biotechnology*, 15:620 (1997); Templeton et al., *Nature Biotechnology*, 15:647 (1997); Hofland et al., *Pharmaceutical Research*, 14:742 (1997)).

Otros sistemas de administración liposómica incluyen, por ejemplo, el uso de micelas inversas, liposomas aniónicos y liposomas de polímero. Las micelas inversas se desvelan en la patente de EE.UU. N.º 6.429.200. Los liposomas aniónicos se desvelan en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20030026831. Los liposomas de polímero que incorporan dextrina o polímeros de glicerol-fosfolina se desvelan en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20020081736 y 20030082103, respectivamente.

Un sistema de administración génica que contiene un ácido nucleico encapsulado para administración sistémica debe ser pequeño (es decir, menos de aproximadamente 100 nm de diámetro) y debe permanecer intacto en la circulación durante un periodo de tiempo prolongado con el fin de lograr la administración a los tejidos afectados. Esto requiere una partícula que contiene ácido nucleico resistente al suero altamente estable que no interaccione con células y otros componentes del compartimento vascular. La partícula debe también interaccionar fácilmente con células diana en un sitio de enfermedad con el fin de facilitar la administración intracelular de un ácido nucleico deseado.

Trabajo reciente ha mostrado que los ácidos nucleicos pueden encapsularse en "partículas de plásmido-lípido estabilizadas" (SPLP) pequeñas (por ejemplo, aproximadamente 70 nm de diámetro) que consisten en un único plásmido encapsulado dentro de una vesícula de lípido bicapa (Wheeler et al., *Gene Therapy*, 6:271 (1999)). Estas SPLP normalmente contienen el lípido "fusogénico" dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), bajos niveles de lípido catiónico, y se estabilizan en medios acuosos por la presencia de un recubrimiento de poli(etilenglicol) (PEG). Las

SPLP tienen aplicación sistémica, ya que presentan vidas en circulación prolongadas tras la inyección intravenosa (i.v.), se acumulan preferencialmente en sitios tumorales distales debido a la potenciada permeabilidad vascular en tales regiones, y pueden mediar en la expresión transgénica en estos sitios tumorales. Los niveles de expresión transgénica observados en el sitio tumoral tras la inyección i.v. de SPLP que contienen el gen marcador de luciferasa son superiores a los niveles que pueden lograrse empleando ADN de complejos de plásmido-liposoma catiónico (lipoplejos) o ADN desnudo.

Así, sigue existiendo una fuerte necesidad en la materia de métodos y composiciones novedosos y más eficientes para introducir ácidos nucleicos tales como ARNip en células. Además, existe una necesidad en la materia de métodos de regulación por disminución de la expresión de genes de interés para tratar o prevenir enfermedades y trastornos tales como cáncer y aterosclerosis. La presente invención trata estas y otras necesidades.

La publicación de patente de EE.UU. N.º 2005064595 desvela ARN interferente encapsulado en lípidos.

La publicación de patente de EE.UU. N.º 2006008910 desvela ARN interferente encapsulado en lípidos.

La publicación de patente WO N.º 2006053430 desvela el silenciamiento de ARNip de apolipoproteína b. La publicación de patente WO N.º No 2007056861 desvela el silenciamiento de ARNip de la expresión génica del virus de la gripe.

La publicación de patente WO N.º 2005035764 desvela ácidos nucleicos autógenos que codifican una ARN polimerasa secretable.

La publicación de patente WO N.º 2006002538 desvela moléculas de ARNip inmunoestimulantes y usos de las mismas.

Breve resumen de la invención

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

La presente invención proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

- (a) un ácido nucleico;
- (b) un lípido catiónico que comprende del 50 % en moles al 65 % en moles del lípido total presente en la partícula;
- (c) un lípido no catiónico que comprende hasta el 49,5 % en moles del lípido total presente en la partícula y que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en la que el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % en moles al 40 % en moles del lípido total presente en la partícula; y
- (d) un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas que comprende del 0,5 % en moles al 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones preferidas, el agente activo o agente terapéutico está completamente encapsulado dentro de la porción de lípido de la partícula de lípido de forma que el agente activo o agente terapéutico en la partícula de lípido sea resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, por ejemplo, por una nucleasa o proteasa. En otras realizaciones preferidas, las partículas de lípido son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos tales como los seres humanos.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona partículas de lípido que comprenden: (a) uno o más agentes activos o agentes terapéuticos; (b) uno o más lípidos catiónicos que comprenden de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 49,5 % 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 el 0,5 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

Más particularmente, la presente divulgación proporciona partículas de ácido nucleico-lípido estables en suero (SNALP) que comprenden un ácido nucleico (por ejemplo, una o más moléculas de ARN interferente tales como ARNip, ARNia y/o miARN), métodos de preparación de SNALP, y métodos de suministro y/o de administración de SNALP (por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno).

En ciertos aspectos, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprende: (a) un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN interferente); (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles del lípido total presente en la

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

En un aspecto preferido, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprende: (a) un ARNip; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 56,5 % en moles a aproximadamente el 66,5 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente el 31,5 % en moles a aproximadamente el 42,5 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta partícula de ácido nucleico-lípido se denomina generalmente en el presente documento la formulación "1:62".

En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP) comprende: (a) un ARNip; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 52 % en moles a aproximadamente el 62 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo que comprende de aproximadamente el 36 % en moles a aproximadamente el 47 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización preferida de la partícula de ácido nucleico-lípido se denomina generalmente en el presente documento la formulación "1:57".

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un método de introducción de 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, opcionalmente en el que la célula es una célula de mamífero.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona métodos de introducción de un agente activo o agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una partícula de lípido descrita en el presente documento tal como una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP).

La presente invención también proporciona la partícula de ácido nucleico-lípido de la invención para su uso en un método para la administración *in vivo* de un ácido nucleico, comprendiendo el método administrar dicha partícula de ácido nucleico-lípido a un sujeto mamífero.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona métodos para la administración *in vivo* de un agente activo o agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico), comprendiendo el método administrar a un sujeto mamífero una partícula de lípido descrita en el presente documento tal como una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP).

La presente invención también proporciona una partícula de ácido nucleico-lípido de la invención para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha partícula de ácido nucleico-lípido al sujeto mamífero, en la que la enfermedad o trastorno se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en una infección vírica, un enfermedad o trastorno del hígado, y cáncer.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar al sujeto mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de lípido descrita en el presente documento tal como una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP).

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 ilustra datos que demuestran la actividad de SNALP 1:57 que contiene ARNip de Eg5 en una línea de células de cáncer de colon humano.

La Figura 2 ilustra datos que demuestran la actividad de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB tras la administración intravenosa en ratones.

La Figura 3 ilustra datos adicionales que demuestran la actividad de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB tras la administración intravenosa en ratones. Cada barra representa la media por grupo de cinco animales. Las barras de error indican la desviación estándar.

La Figura 4 ilustra datos que demuestran la actividad de SNALP 1:57 y 1:62 que contiene ARNip de ApoB tras la administración intravenosa en ratones.

La Figura 5 ilustra datos que demuestran la actividad de SNALP 1:62 que contiene ARNip de ApoB tras la administración intravenosa en ratones.

La Figura 6 ilustra datos que demuestran que la tolerabilidad de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB preparado por dilución directa en tampón citrato frente a PBS no se diferenció significativamente en términos de parámetros de bioquímica clínica de la sangre.

La Figura 7 ilustra datos que demuestran que la eficacia de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB preparado por bomba de engranajes fue similar a la misma SNALP preparada por prensa de jeringa.

La Figura 8 ilustra datos que demuestran que hubo muy poco efecto sobre el peso corporal 24 horas después de la administración de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB.

La Figura 9 ilustra datos que demuestran que no hubo cambios obvios en la cifra de plaquetas después de la administración de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB.

La Figura 10 ilustra datos que demuestran que ocurrieron elevaciones de enzima hepática clínicamente significativas (3xULN) a dosificaciones de fármaco particulares de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB.

La Figura 11 ilustra datos que demuestran que la potencia de SNALP 1:57 de lípido:fármaco (L:D) más baja que contiene ARNip de ApoB fue tan buena como la de SNALP de L:D más alta a todas las dosificaciones de fármaco probadas.

La Figura 12 ilustra datos que demuestran que se redujeron los niveles de proteína ApoB y de colesterol total a un grado similar por SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB a una relación L:D de entrada de 6:1 (relación final de 7:1) y SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada de 9:1 (relación final de 10:1).

La Figura 13 ilustra datos que demuestran que una pauta de tratamiento de SNALP 1:57 con ARNip que se dirige a PLK-1 es bien tolerada sin signos evidentes de toxicidad relacionada con el tratamiento en ratones portadores de tumores de hígado Hep3B.

La Figura 14 ilustra datos que demuestran que el tratamiento con SNALP 1:57 que contiene ARNip de PLK-1 causó un aumento significativo en la supervivencia de ratones portadores de tumores Hep3B.

La Figura 15 ilustra datos que demuestran que el tratamiento con SNALP 1:57 que contiene ARNip de PLK-1 redujo los niveles de ARNm de PLK-1 el 50 % en tumores Hep3B intrahepáticos que crecen en ratones 24 horas después de la administración de SNALP.

La Figura 16 ilustra datos que demuestran que un producto de escisión específico de ARNm de PLK-1 fue detectable por 5' RACE-PCR en ratones tratados con SNALP 1:57 que contenía ARNip de PLK-1. Se cargaron 10 µl de producto de PCR/pocillo en un gel al 1,5 % de agarosa. Carriles N.º (1) marcador de peso molecular (MW); (2) PBS ratón 1; (3) PBS ratón 2; (4) PBS ratón 3; (5) Luc SNALP ratón 1; (6) Luc SNALP ratón 2; (7) PLK SNALP ratón 1; (8) PLK SNALP ratón 2; (9) PLK SNALP ratón 3; y (10) sin control de molde.

La Figura 17 ilustra datos que demuestran que los ratones tratados con SNALP 1:57 de control (Luc) presentaron mitosis normales en tumores Hep3B (paneles superiores), mientras que los ratones tratados con SNALP 1:57 que contenía ARNip de PLK-1 presentaron numerosas mitosis anómalas y apoptosis de células tumorales en tumores Hep3B (paneles inferiores).

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

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

La Figura 20 ilustra datos que demuestran que PLK-1 PEG-cDSA SNALP inhibió el crecimiento de tumores Hep3B S.C. grandes.

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

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

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento que las partículas de lípido que comprenden de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles de un lípido catiónico, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles de un lípido no catiónico y de aproximadamente el 0,5 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles de un lípido conjugado proporcionan ventajas cuando se usan para la administración *in vitro* o *in vivo* de un agente activo, tal como un ácido nucleico terapéutico (por ejemplo, un ARN interferente). En particular, como se ilustra por los ejemplos en el presente documento, en el presente documento se describen partículas de ácido nucleico-lípido (SNALP) estables que confieren actividad ventajosamente elevada del ácido nucleico encapsulado (por ejemplo, un ARN interferente tal como ARNip) y tolerabilidad mejorada de las formulaciones *in vivo*, produciendo un aumento significativo en el índice terapéutico en comparación con las composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido previamente descritas. Adicionalmente, las SNALP descritas en el presente documento son estables en circulación, por ejemplo, resistentes a la degradación por nucleasas en suero, y son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos tales como los seres humanos. Como ejemplo no limitante, la Figura 3 del Ejemplo 4 muestra que una realización de SNALP de la invención ("SNALP 1:57") fue más de 10 veces más eficaz en comparación con una partícula de ácido nucleico-lípido previamente descrita ("SNALP 2:30") en mediar en el silenciamiento de genes diana a una dosis 10 veces más baja. Similarmente, la Figura 2 del Ejemplo 3 muestra que la formulación "SNALP 1:57" fue sustancialmente más eficaz en el silenciamiento de la expresión de un gen diana en comparación con las partículas de ácido nucleico-

lípidos previamente descritas ("SNALP 2:40").

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona composiciones mejoradas para la administración de ARN interferente tal como moléculas de ARNip. En particular, los ejemplos en el presente documento ilustran que las formulaciones de partículas de lípido mejoradas descritas en el presente documento son altamente eficaces en regular por disminución los niveles de ARNm y/o de proteína de genes diana. Además, los ejemplos en el presente documento ilustran que la presencia de ciertas relaciones molares de componentes de lípido produce actividad mejorada o potenciada de estas formulaciones de partículas de lípido de la presente divulgación. Por ejemplo, las formulaciones "SNALP 1:57" y "SNALP 1:62" descritas en el presente documento son particularmente ventajosas debido a que proporcionan eficacia y tolerabilidad mejoradas *in vivo*, son estables en suero, son sustancialmente no tóxicas, son capaces de acceder a sitios extravasculares, y son capaces de llegar a poblaciones de células diana.

Las partículas de lípido y las composiciones de la presente divulgación pueden usarse para una variedad de fines, que incluyen la administración de agentes terapéuticos asociados o encapsulados a células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos de tratamiento de enfermedades o trastornos en un sujeto en necesidad de los mismos, poniendo en contacto el sujeto con una partícula de lípido descrita en el presente documento que comprende uno o más agentes terapéuticos adecuados.

Diversas realizaciones a modo de ejemplo de las partículas de lípido de la presente divulgación, además de las composiciones y formulaciones que las comprenden, y su uso para administrar agentes terapéuticos y modular la expresión de genes y proteínas diana, se describen en más detalle más adelante.

II. Definiciones

Como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a ellos, a menos que se especifique lo contrario.

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

El ARN interferente incluye "ARN interferente pequeño" o "ARNip", por ejemplo, ARN interferente de aproximadamente 15-60, 15-50 o 15-40 nucleótidos (dúplex) de longitud, más normalmente aproximadamente 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos (dúplex) de longitud, y tiene preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos (dúplex) de longitud (por ejemplo, cada secuencia complementaria del ARNip 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 ARNip 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 ARNip pueden comprender nucleótidos protuberantes en 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos y extremos fosfato de 5'. Ejemplos de ARNip incluyen, sin limitación, una molécula de polinucleótidos bicatenaria ensamblada a partir de dos moléculas de cadenas separadas, en la que una hebra es la hebra codificante y la otra es la hebra no codificante complementaria; una molécula de polinucleótidos bicatenaria ensamblada a partir de una molécula monocatenaria, donde las regiones codificantes y no codificantes están unidas por un conector basado en ácido nucleico o no basado en ácido nucleico; una molécula de polinucleótidos bicatenaria con una estructura secundaria de horquilla que tiene regiones codificantes y no codificantes auto-complementarias; y una molécula de polinucleótidos monocatenaria circular con dos o más estructuras de lazo 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 ARNip bicatenaria activa.

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

plásmido (por ejemplo, transcrito como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con lazos en horquilla).

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

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

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

Como se usa en el presente documento, el término "célula respondedora" se refiere a una célula, preferentemente una célula de mamífero, que produce una respuesta inmunitaria detectable cuando se pone en contacto con un ARN interferente inunoestimulante tal como un ARNip no modificado. Células respondedoras a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, células dendríticas, macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), esplenocitos, y similares. Respuestas inmunitarias detectables incluyen, por ejemplo, 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-10, IL-12, IL-13, TGF, y combinaciones de los mismos.

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

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

Condiciones de hibridación rigurosas a modo de ejemplo pueden ser del siguiente modo: 50 % de formamida, 5x SSC y 1 % de SDS, incubar a 42 °C, o, 5x SSC, 1 % de SDS, incubar a 65 °C, con lavado en 0,2x SSC, y 0,1 % de SDS a 65 °C. Para PCR, una temperatura de aproximadamente 36 °C es típica para la amplificación de baja rigurosidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre aproximadamente 32 °C y 48 °C dependiendo de la longitud del cebador. Para amplificación por PCR de alta rigurosidad, una temperatura de aproximadamente 62 °C es típica, aunque las temperaturas de hibridación de alta rigurosidad pueden oscilar de

aproximadamente 50 °C a aproximadamente 65 °C, dependiendo de la longitud del cebador y la especificidad. Condiciones de ciclo típicas para tanto las amplificaciones de alta como de 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 pautas para reacciones de amplificación de alta y baja 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 se hibridan entre sí bajo condiciones rigurosas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto se produce, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos normalmente se hibridan bajo condiciones de hibridación moderadamente rigurosas. "Condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" a modo de ejemplo incluyen una hibridación en un tampón de 40 % de formamida, NaCl 1 M, 1 % de SDS a 37 °C, y un lavado en 1X SSC a 45 °C. Una hibridación positiva es al menos dos veces el fondo. Aquellos expertos habituales reconocerán fácilmente que pueden utilizarse condiciones de hibridación y de lavado alternativas para proporcionar condiciones de rigurosidad similar. Pautas adicionales para determinar parámetros de hibridación se proporcionan en numerosas referencias, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds.

Los términos "sustancialmente idénticos" o "identidad sustancial", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje de nucleótidos especificado que es el mismo (es decir, al menos aproximadamente el 60 %, preferentemente al menos aproximadamente el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, o el 95 % de identidad en una región especificada), cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima en una ventana de comparación, o región diseñada como se mide usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento manual e inspección visual. Esta definición, cuando el contexto lo indica, también se refiere análogamente al complemento de una secuencia. Preferentemente, la identidad sustancial existe en una región que tiene al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 nucleótidos de longitud.

Para comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa de una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Si se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se entran en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si fuera necesario, y se designan parámetros de programa de algoritmo de secuencia. Pueden usarse parámetros de programa por defecto, o pueden designarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basado en los parámetros de programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, incluye referencia a un segmento de una cualquiera de varias posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consiste en de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, normalmente aproximadamente 10 a aproximadamente 45, más normalmente aproximadamente 15 a aproximadamente 30, en la que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son muy conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de secuencias para la comparación puede realizarse, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math., 2:482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol., 48:443 (1970), por la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988), por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds. (suplemento de 1995)).

Un ejemplo preferido de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencias 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 de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. El software para realizar análisis de BLAST está públicamente disponible mediante el centro Nacional para Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

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

El término "ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en tanto forma mono como bicatenaria e incluye ADN y ARN. El ADN puede estar en forma de, por ejemplo, moléculas antisentido, ADN de plásmido, ADN pre-condensado, un producto de PCR, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico, o derivados y combinaciones de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARNip, ARN interferente asimétrico (ARNia), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARNt, ARN vírico (ARNv), y combinaciones de los mismos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de esqueleto modificados, que son sintéticos, que existen de forma natural, y que no existen de forma natural, y que tienen propiedades de unión similares como el ácido nucleico de referencia. Ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metilfosfonatos, metilfosfonatos quirales, 2'-O-metilribonucleótidos y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). A menos que se limite específicamente, el término engloba ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares como el ácido nucleico de referencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácidos nucleicos particular también engloba implícitamente variantes conservativamente modificadas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codón degenerado), alelos, ortólogos, SNP, y secuencias complementarias, además de la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codón degenerado pueden lograrse generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con restos de base mixta y/o 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 una desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN) de azúcar, una base, y un grupo fosfato. Los nucleótidos se unen juntos mediante 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 no se limitan a, modificaciones que ponen nuevos grupos reactivos tales como, pero no se limitan a, aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y haluros de alquilo.

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

"Producto génico", 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 no se limita a, ésteres de ácidos grasos y se caracterizan por ser insolubles en agua, pero solubles en muchos disolventes orgánicos. Se dividen normalmente en al menos tres clases: (1) "lípidos simples" que incluyen grasas y aceites, además de ceras; (2) "lípidos compuestos", que incluyen fosfolípidos y glicolípidos; y (3) "lípidos derivados", tales como esteroides.

Una "partícula de lípidos" se usa en el presente documento para referirse a una formulación de lípidos que puede usarse para administrar un agente activo o agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN interferente), a un sitio diana de interés. En la partícula de lípidos de la presente divulgación, que normalmente se forma a partir de un lípidos catiónico, un lípidos no catiónico y un lípidos conjugado que previene la agregación de la partícula, el agente activo o agente terapéutico puede encapsularse en el lípidos, protegiendo así el agente de la degradación enzimática.

Como se usa en el presente documento, el término "SNALP" se refiere a una partícula de ácido nucleico-lípidos estable. Una SNALP representa una partícula hecha de lípidos (por ejemplo, un lípidos catiónico, un lípidos no catiónico y un conjugado de lípidos que previene la agregación de la partícula), en el que el ácido nucleico (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN, ADNmc, ADNbc, ARNmc, ARN de horquilla pequeña (ARNhp), ARNbc, o un plásmido, que incluye plásmidos de los que se transcribe un ARN interferente) se encapsula completamente dentro del lípidos. Como se usa en el presente documento, el término "SNALP" incluye una SPLP, que es el término usado para referirse a una partícula de ácido nucleico-lípidos que comprende un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido) encapsulado dentro del lípidos. SNALP y SPLP normalmente contienen un lípidos catiónico, un lípidos no catiónico y un conjugado de lípidos (por ejemplo, un conjugado de PEG-lípidos). SNALP y SPLP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que pueden presentar vidas en circulación prolongadas tras la inyección intravenosa (i.v.), pueden acumularse en sitios distales (por ejemplo, sitios físicamente separados del sitio de administración), y pueden mediar en la expresión del gen transfectado o silenciar la expresión del gen diana en estos sitios distales. SPLP incluyen "pSPLP", que comprenden un complejo de agente de condensación-ácido nucleico encapsulado como se expone en la publicación PCT N.º WO 00/03683.

Las partículas de lípidos descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) normalmente tienen un diámetro medio 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, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas de lípidos, son resistentes en solución acuosa a la degradación con una nucleasa. Partículas de ácido nucleico-lípidos y su método de preparación se desvelan en, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20040142025 y 20070042031.

Como se usa en el presente documento, "lípidio encapsulado" puede referirse a una partícula de lípidio que proporciona un agente activo o agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN interferente), con encapsulación completa, encapsulación parcial, o ambos. En una realización preferida, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula de lípidio (por ejemplo, para formar una SPLP, pSPLP, SNALP, u otra partícula de ácido nucleico-lípidio).

El término "conjugado de lípidio" se refiere a un conjugado de lípidio que inhibe la agregación de partículas de lípidio. Tales conjugados de lípidio incluyen, pero no se limitan a, oligómeros de poliamida (por ejemplo, conjugados de ATTA-lípidio), conjugados de PEG-lípidio, tales como PEG acoplado a dialquioxipropilos, PEG acoplado a diacilglicerol, PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas, PEG acoplado a ceramidas (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.885.613), lípidos de PEG catiónicos, y mezclas de los mismos. El PEG puede conjugarse directamente con el lípidio o puede unirse al lípidio mediante un resto conector. Puede usarse cualquier resto conector adecuado para acoplar el PEG con un lípidio que incluye, por ejemplo, restos conectores que no contienen éster y restos conectores que contienen éster. En realizaciones preferidas, se usan restos conectores que no contienen éster.

El término "lípidio anfipático" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado en el que la porción hidrófoba del material de lípidio se orienta a una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas derivan de la presencia de grupos polares o cargados, tales como hidratos de carbono, grupos fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo, y otros grupos similares. La hidrofobia puede conferirse por la inclusión de grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a, grupos de hidrocarburo alifático saturado e insaturado de cadena larga y tales grupos sustituidos con uno o más grupo(s) aromático(s), cicloalifático(s) o heterocíclico(s). Ejemplos de compuestos anfipáticos incluyen, pero no se limitan a, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos.

Ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípido, familias de glucoesfingolípido, diacilglicerol y β -aciloxiácidos, también están dentro del grupo designado como lípidos anfipáticos. Adicionalmente, los lípidos anfipáticos descritos anteriormente pueden mezclarse con otros lípidos que incluyen triglicéridos y esteroides.

El término "lípidio neutro" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidio que existen o bien en una forma de ión bipolar no cargada o bien neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilglicerol.

El término "lípidio no catiónico" se refiere a cualquier lípidio anfipático, además de cualquier otro lípidio neutro o lípidio aniónico.

El término "lípidio aniónico" se refiere a cualquier lípidio que está negativamente cargado a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a, fosfatidilglicerol, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoilfosfatidiletanolaminas, N-succinilfosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilglicerol, palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

El término "lípidio catiónico" se refiere a cualquiera de varias especies de lípidos que llevan una carga positiva neta a un pH seleccionado, tal como pH fisiológico (por ejemplo, pH de aproximadamente 7,0). Se ha encontrado sorprendentemente que los lípidos catiónicos que comprenden cadenas de alquilo con múltiples sitios de insaturación, por ejemplo, al menos dos o tres sitios de insaturación, son particularmente útiles para formar partículas de lípidio con elevada fluidez de la membrana. Se han descrito varios lípidos catiónicos y análogos relacionados, que también son útiles en la presente invención, en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20060083780 y 20060240554; las patentes de EE.UU. N.º 5.208.036; 5.264.618; 5.279.833; 5.283.185; 5.753.613; y 5.785.992; y publicación PCT N.º WO 96/10390. Ejemplos no limitantes de lípidos catiónicos se describen en detalle en el presente documento. En algunos casos, los lípidos catiónicos comprenden un grupo de cabeza de amina terciaria protonable (por ejemplo, titula el pH), cadenas de alquilo C18, enlaces éter entre el grupo de cabeza y las cadenas de alquilo, y 0 a 3 dobles enlaces. Tales lípidos incluyen, por ejemplo, DSDMA, DLinDMA, DLenDMA y DODMA.

El término "lípidio hidrófobo" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a, grupos de hidrocarburo alifático saturado e insaturado de cadena larga y tales grupos opcionalmente sustituidos con uno o más grupo(s) aromático(s), cicloalifático(s) o heterocíclico(s). Ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a, diacilglicerol, dialquilglicerol, N,N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

El término "fusogénico" se refiere a la capacidad de una partícula de lípidio, tal como una SNALP, para fusionarse

con las membranas de una célula. Las membranas pueden ser o bien la membrana plasmática o bien membranas que rodean orgánulos, por ejemplo, endosoma, núcleo, etc.

5 Como se usa en el presente documento, el término "solución acuosa" se refiere a una composición que comprende por completo, o en parte, agua.

Como se usa en el presente documento, el término "solución orgánica de lípido" se refiere a una composición que comprende por completo, o en parte, un disolvente orgánico que tiene un lípido.

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

15 "Estable en suero", en relación con partículas de ácido nucleico-lípido tales como SNALP, significa que la partícula no se degrada significativamente después de la exposición a un suero o ensayo de nucleasa que degradaría significativamente el ADN o ARN libre. Ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo en suero estándar, un ensayo de DNasa, o un ensayo de RNasa.

20 "Administración sistémica", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de partículas de lípido que conduce a una amplia biodistribución de un agente activo o agente terapéutico, tal como un ARN interferente dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir a la administración sistémica de ciertos agentes, pero no otros. Administración sistémica significa que una cantidad útil, preferentemente terapéutica, de un agente se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. Para obtener la amplia biodistribución generalmente se requiere una vida en sangre tal que el agente no sea rápidamente degradado o eliminado (tal como por órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o por la rápida unión a células no específicas) antes de llegar a un sitio de enfermedad distal al sitio de administración. La administración sistémica de partículas de lípido puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica que incluye, por ejemplo, intravenoso, subcutáneo e intraperitoneal. En una realización preferida, la administración sistémica de partículas de lípido es por administración intravenosa.

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

35 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.

40 El término "cáncer" se refiere a cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento incontrolado de células anómalas. El término incluye todos los cánceres conocidos y afecciones neoplásicas, tanto si se caracterizan como malignas, benignas, tejido blando, o sólidas, como cánceres de todos los estadios y grados que incluyen cánceres pre- y post-metastásicos. Ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer anal, cáncer de las vías biliares, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de esófago; cáncer de vesícula biliar, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de apéndice, cáncer de mama, cáncer de ovario; cáncer de cuello uterino, 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 de sangre. Ejemplos no limitantes de tipos específicos de cáncer de hígado incluyen carcinoma hepatocelular (HCC), cáncer de hígado secundario (por ejemplo, producido por la metástasis de algún otro tipo de célula de cáncer no de hígado) y hepatoblastoma. Como se usa en el presente documento, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

50 III. Descripción de las realizaciones

La presente divulgación proporciona novedosas partículas de lípido estables en suero que comprenden uno o más agentes activos o agentes terapéuticos, métodos de preparación de las partículas de lípido, y métodos de suministro y/o administración de las partículas de lípido (por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno).

60 En un aspecto, la presente divulgación proporciona partículas de lípido que comprenden: (a) uno o más agentes activos o agentes terapéuticos; (b) uno o más lípidos catiónicos que comprenden de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 49,5 % 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 el 0,5 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

65 En ciertas realizaciones, el agente activo o agente terapéutico está completamente encapsulado dentro de la porción de lípido de la partícula de lípido de forma que el agente activo o agente terapéutico en la partícula de lípido sea

resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, por ejemplo, por una nucleasa o proteasa. En ciertas otras realizaciones, las partículas de lípido son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos tales como los seres humanos.

5 En algunas realizaciones, el agente activo o agente terapéutico comprende un ácido nucleico. En ciertos casos, el ácido nucleico comprende una molécula de ARN interferente tal como, por ejemplo, un ARNip, ARNia, miARN, o mezclas de los mismos. En ciertos 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 inmunoestimulante, o mezclas de los mismos.

10 En otras realizaciones, el agente activo o agente terapéutico comprende un péptido o polipéptido. En ciertos casos, el péptido o polipéptido comprende un anticuerpo tal como, por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un fragmento de anticuerpo; un anticuerpo humanizado, un anticuerpo recombinante, un anticuerpo humano recombinante, un anticuerpo Primatized™, o mezclas de los mismos. En ciertos otros casos, el péptido o polipéptido comprende una citocina, un factor de crecimiento, un factor apoptótico, un factor inductor de la diferenciación, un receptor de la superficie celular, un ligando, una hormona, una molécula pequeña (por ejemplo, molécula orgánica pequeña o compuesto), o mezclas de los mismos.

20 En realizaciones preferidas, el agente activo o agente terapéutico comprende un ARNip. En una realización, la molécula de ARNip comprende una región bicatenaria de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (por ejemplo, aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, o 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud). Las moléculas de ARNip descritas en el presente documento son capaces de silenciar la expresión de una secuencia diana *in vitro* y/o *in vivo*.

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

35 En otras realizaciones, la molécula de ARNip comprende nucleótidos modificados que incluyen, pero no se limitan a, nucleótidos de 2'-O-metilo (2'OMe), nucleótidos de 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA), y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el ARNip comprende nucleótidos de 2'OMe (por ejemplo, nucleótidos de purina y/o pirimidina de 2'OMe) tal como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, nucleótidos de 2'OMe-citosina, y mezclas de los mismos. En ciertos casos, el ARNip no comprende nucleótidos de 2'OMe-citosina. En otras realizaciones, el ARNip comprende una estructura de lazo en horquilla.

45 El ARNip puede comprender nucleótidos modificados en una hebra (es decir, codificante o no codificante) o ambas hebras de la región bicatenaria de la molécula de ARNip. Preferentemente, los nucleótidos de uridina y/o guanosina se modifican en posiciones selectivas en la región bicatenaria del dúplex de ARNip. Con respecto a las modificaciones del nucleótido 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 puede 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 los nucleótidos de guanosina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o más de los nucleótidos de guanosina en la hebra codificante y/o no codificante puede 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.

55 En ciertas realizaciones, pueden modificarse al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más motivos 5'-GU-3' en una secuencia de ARNip, por ejemplo, introduciendo desapareamientos para eliminar los motivos 5'-GU-3' y/o introduciendo nucleótidos modificados tales como nucleótidos de 2'OMe. El motivo 5'-GU-3' puede estar en la hebra codificante, la hebra no codificante, o ambas hebras, de la secuencia de ARNip. Los motivos 5'-GU-3' pueden estar adyacentes entre sí o, alternativamente, pueden estar separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, o más nucleótidos.

60 En algunas realizaciones preferidas, una molécula de ARNip modificado es menos inmunoestimulante que una secuencia de ARNip no modificado correspondiente. En tales realizaciones, la molécula de ARNip modificado con propiedades inmunoestimulantes reducidas retiene ventajosamente la actividad de iARN contra la secuencia diana. En otra realización, las propiedades inmunoestimulantes de la molécula de ARNip modificado y su capacidad para silenciar la expresión del gen diana pueden equilibrarse u optimizarse por la introducción de modificaciones de

2'OMe mínimas y selectivas dentro de la secuencia de ARNip tal como, por ejemplo, dentro de la región bicatenaria del dúplex de ARNip. En ciertos casos, el ARNip modificado es al menos aproximadamente el 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 el 100 % menos inmunoestimulante que el ARNip no modificado correspondiente. Será rápidamente evidente para aquellos expertos en la materia que las propiedades inmunoestimulantes de la molécula de ARNip modificado y la molécula de ARNip no modificado correspondiente pueden ser determinadas, 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 la transfección de una célula respondedora de mamífero usando un sistema de administración basado en lípidos apropiado (tal como el sistema de administración de SNALP desvelado en el presente documento).

En ciertas realizaciones, una molécula de ARNip modificado tiene una CI_{50} (es decir, concentración inhibitoria al 50 %) inferior o igual a diez veces la del ARNip no modificado correspondiente (es decir, el ARNip modificado tiene una CI_{50} que es inferior o igual a diez veces la CI_{50} del ARNip no modificado correspondiente). En otras realizaciones, el ARNip modificado tiene una CI_{50} inferior o igual a tres veces la de la secuencia de ARNip no modificado correspondiente. En aún otras realizaciones, el ARNip modificado tiene una CI_{50} inferior o igual a dos veces la del ARNip no modificado correspondiente. Será rápidamente evidente para aquellos expertos en la materia que puede generarse una curva de dosis-respuesta y los valores de CI_{50} para el ARNip modificado y el ARNip no modificado correspondiente pueden determinarse fácilmente usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia.

En otra realización más, una molécula de ARNip modificado es capaz de silenciar al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o el 100 % de la expresión de la secuencia diana con respecto a la secuencia de ARNip no modificado correspondiente.

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

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

En ciertos 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 ciertos otros casos, los nucleótidos cerca del extremo 3' (por ejemplo, dentro de uno, dos, tres, o cuatro nucleótidos del extremo 3') de la región bicatenaria en la hebra codificante y/o no codificante no son nucleótidos modificados.

Las moléculas de ARNip descritas en el presente documento pueden tener nucleótidos protuberantes en 3' de uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos en uno o ambos lados de la región bicatenaria, o pueden carecer de nucleótidos protuberantes (es decir, tener extremos romos) en uno o ambos lados de la región bicatenaria. Preferentemente, el ARNip tiene nucleótidos protuberantes en 3' de dos nucleótidos en cada lado de la región bicatenaria. En ciertos casos, el nucleótido protuberante en 3' en la hebra no codificante tiene complementariedad con la secuencia diana y el nucleótido protuberante en 3' en la hebra codificante tiene complementariedad con una hebra complementaria de la secuencia diana. Alternativamente, los nucleótidos protuberantes en 3' no tienen complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria de la misma. En algunas realizaciones, los nucleótidos protuberantes en 3' comprenden uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos tales como 2'-desoxi (2'-H)-nucleótidos. En ciertas realizaciones preferidas, los nucleótidos protuberantes en 3' comprenden nucleótidos de desoxitimidina (dT) y/o uridina. En otras realizaciones, uno o más de los nucleótidos en los nucleótidos protuberantes en 3' en uno o ambos lados de la región bicatenaria comprenden nucleótidos modificados. Ejemplos no limitantes de nucleótidos modificados se describen anteriormente e incluyen nucleótidos de 2'OMe, nucleótidos de 2'-desoxi-2'F, 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-2-MOE, nucleótidos de LNA, y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos en los nucleótidos protuberantes en 3' presentes en la hebra codificante y/o no codificante del ARNip comprenden nucleótidos de 2'OMe (por ejemplo, nucleótidos de purina y/o pirimidina de 2'OMe) tales como, por ejemplo, nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, nucleótidos de 2'OMe-adenosina, nucleótidos de 2'OMe-citosina, y mezclas de los mismos.

El ARNip puede comprender al menos uno o una mezcla (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más) de secuencias de ARNip no modificado y/o modificado que silencian la expresión del gen diana. La mezcla de ARNip 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 ciertos casos, uno o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más) ARNip modificados que

silencian la expresión del gen diana están presentes en una mezcla. En ciertos otros casos, una o más (por ejemplo, al menos dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más) secuencias de ARNip no modificado que silencian la expresión del gen diana están presentes en una mezcla.

- 5 En algunas realizaciones, la hebra no codificante de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es al menos aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % complementaria a la secuencia diana o una porción de la misma. En otras realizaciones, la hebra no codificante de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es el 100 % complementaria a la secuencia diana o una porción de la misma. En realizaciones adicionales, la hebra no codificante de la molécula de ARNip comprende o consiste en una
10 secuencia que se hibrida específicamente con la secuencia diana o una porción de la misma.

- En realizaciones adicionales, la hebra codificante de la molécula de ARNip comprende o consiste en una secuencia que es al menos aproximadamente el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia diana o una porción de la misma. En realizaciones adicionales, la hebra codificante de la molécula de ARNip
15 comprende o consiste en una secuencia que es el 100 % idéntica a la secuencia diana o una porción de la misma.

- En las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP que comprende un ARN interferente tal como ARNip), el lípido catiónico puede comprender, por ejemplo, uno o más de los siguientes: 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2"), 2,2-dilinoileil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA), 2,2-dilinoileil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoileil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA),
25 1,2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileiltio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloruro de 1,2-dilinoileloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoileil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoileilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoileiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-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-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidoglicilespermina (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'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), o mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones preferidas, el lípido
40 catiónico es DLinDMA, DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), o mezclas de los mismos.

- La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA y DLin-K-MPZ, además de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/104.212, presentada el 9 de octubre de 2008. La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-K-DMA, DLin-C-DAP, DLin-DAC, DLin-MA, DLinDAP, DLin-S-DMA, DLin-2-DMA, DLin-TMA.Cl, DLin-TAP.Cl, DLin-MPZ, DLinAP, DOAP y DLin-EG-DMA, además de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la solicitud PCT N.º PCT/US08/88676, presentada el 31 de diciembre de 2008. La síntesis de lípidos catiónicos tales como CLinDMA, además de lípidos catiónicos adicionales, se describe en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20060240554.

- 50 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 75 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 70 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 65 % en moles, o de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles del lípido total presente en la
55 partícula.

- En otras realizaciones, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles, de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 75 % en moles, de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 70 % en moles, o de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 65 % en moles del lípido total presente en la
60 partícula.

- 65 En aún otras realizaciones, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 60 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 60 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles,

de aproximadamente el 60 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, de aproximadamente el 60 % en moles a aproximadamente el 75 % en moles, o de aproximadamente el 60 % en moles a aproximadamente el 70 % en moles del lípido total presente en la partícula.

5 En todavía otras realizaciones, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 65 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 65 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles, de aproximadamente el 65 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, o de aproximadamente el 65 % en moles a aproximadamente el 75 % en moles del lípido total presente en la partícula.

10 En realizaciones adicionales, el lípido catiónico puede comprender de aproximadamente el 70 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 70 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles, de aproximadamente el 70 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, de aproximadamente el 75 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 75 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles, o de aproximadamente el 80 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles del lípido total presente en la partícula.

15 En realizaciones adicionales, el lípido catiónico puede comprender (al menos) aproximadamente el 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 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 el 90 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula.

20 En las partículas de lípido de la presente divulgación (por ejemplo, SNALP que comprende un ARN interferente tal como ARNip), el lípido no catiónico puede comprender, por ejemplo, uno o más lípidos aniónicos y/o lípidos neutros. El lípido no catiónico puede comprender uno de los siguientes componentes de lípido neutro: (1) colesterol o un derivado del mismo; (2) un fosfolípido; o (3) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo.

Ejemplos de derivados de colesterol incluyen, pero no se limitan a, colestanol, colestanona, colestenona, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, colesteryl-4'-hidroxibutil éter, y mezclas de los mismos. La síntesis de colesteryl-2'-hidroxietil éter se describe en el presente documento.

30 El fosfolípido puede ser un lípido neutro que incluye, pero no se limita a, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), fosfatidilcolina de huevo (EPC), y mezclas de las mismas. En ciertas realizaciones preferidas, el fosfolípido es DPPC, DSPC, o mezclas de los mismos.

40 En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 60 % en moles, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 55 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 55 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 55 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 55 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 55 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 50 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 50 % en moles o de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 50 % en moles del lípido total presente en la partícula. Cuando el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente el 40, 50, o 60 % en moles del lípido total presente en la partícula.

50 En otras realizaciones, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, de aproximadamente el 35 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles, o de aproximadamente el 40 % en moles a aproximadamente el 49,5 % en moles del lípido total presente en la partícula.

60 En aún otras realizaciones, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 35 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, o de aproximadamente el 40 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles del lípido total presente en la partícula.

el 45 % en moles, o de aproximadamente el 35 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En todavía otras realizaciones, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, o de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones adicionales, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, o de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones aún adicionales, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, de aproximadamente el 13 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, o de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones adicionales, el lípido no catiónico (por ejemplo, uno o más fosfolípidos y/o colesterol) puede comprender (al menos) aproximadamente el 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 o el 60 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula.

En ciertas realizaciones, el lípido no catiónico comprende colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 31,5 % en moles a aproximadamente el 42,5 % en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de lípido libre de fosfolípido descrita en el presente documento puede comprender colesterol o un derivado del mismo a aproximadamente el 37 % en moles del lípido total presente en la partícula. En otras realizaciones preferidas, una partícula de lípido libre de fosfolípido descrita en el presente documento puede comprender colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, de aproximadamente el 35 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 40 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 32 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 32 % en moles a aproximadamente el 42 % en moles, de aproximadamente el 32 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 34 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 34 % en moles a aproximadamente el 42 % en moles, de aproximadamente el 34 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, o aproximadamente el 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o el 45 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula.

En ciertas otras realizaciones preferidas, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 4 % en moles a aproximadamente el 10 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de lípido que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol puede comprender DPPC a aproximadamente el 7 % en moles y colesterol a aproximadamente el 34 % en moles del lípido total presente en la partícula. En otras realizaciones, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 3 % en moles a aproximadamente el 15 % en moles, de aproximadamente el 4 % en moles a aproximadamente el 15 % en moles, de aproximadamente el 4 % en moles a aproximadamente el 12 % en moles, de aproximadamente el 4 % en moles a aproximadamente el 10 % en moles, de aproximadamente el 4 % en moles a aproximadamente el 8 % en moles, de aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 12 % en moles, de aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 9 % en moles, de aproximadamente el 6 % en moles a aproximadamente el 12 % en moles, de aproximadamente el 6 % en moles a aproximadamente el 10 % en moles, o aproximadamente el 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o el 15 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 25 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 35 % en moles, de aproximadamente el 35 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente el 40 % en moles a aproximadamente el 45 % en moles, de aproximadamente

el 28 % en moles a aproximadamente el 40 % en moles, de aproximadamente el 28 % en moles a aproximadamente el 38 % en moles, de aproximadamente el 30 % en moles a aproximadamente el 38 % en moles, de aproximadamente el 32 % en moles a aproximadamente el 36 % en moles, o aproximadamente el 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44 o el 45 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula.

En realizaciones preferidas adicionales, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de lípido que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol puede comprender DPPC a aproximadamente el 20 % en moles y colesterol a aproximadamente el 20 % en moles del lípido total presente en la partícula. En otras realizaciones, el lípido no catiónico comprende una mezcla de: (i) un fosfolípido de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 20 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, de aproximadamente el 12 % en moles a aproximadamente el 28 % en moles, de aproximadamente el 14 % en moles a aproximadamente el 26 % en moles, o aproximadamente el 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o el 30 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula; y (ii) colesterol o un derivado del mismo de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 20 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 20 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, de aproximadamente el 12 % en moles a aproximadamente el 28 % en moles, de aproximadamente el 14 % en moles a aproximadamente el 26 % en moles, o aproximadamente el 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o el 30 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula.

En las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP que comprende un ARN interferente tal como ARNip), el conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas puede comprender, por ejemplo, uno o más de los siguientes: un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, un conjugado de poliamida (ATTA)-lípido, un conjugado de polímero catiónico-lípido (CPL), o mezclas de los mismos. En una realización preferida, las partículas de ácido nucleico-lípido comprenden o bien un conjugado de PEG-lípido o bien un conjugado de ATTA-lípido. En ciertas realizaciones, el conjugado de PEG-lípido o conjugado de ATTA-lípido se usa junto con un CPL. El conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas puede comprender un PEG-lípido que incluye, por ejemplo, un PEG-diácilglicerol (DAG), un PEG-dialquiloxipropilo (DAA), un PEG-fosfolípido, un PEG-ceramida (Cer), o mezclas de los mismos. El conjugado de PEG-DAA puede ser PEG-dilauriloxipropilo (C12), un PEG-dimiristiloxipropilo (C14), un PEG-dipalmitiloxipropilo (C16), un PEG-diesteariloxipropilo (C18), o mezclas de los mismos.

Conjugados de PEG-lípido adicionales adecuados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, mPEG2000-1,2-di-O-alkil-sn3-carbomoiiglicérido (PEG-C-DOMG). La síntesis de PEG-C-DOMG se describe en la solicitud PCT N.º PCT/US08/88676, presentada el 31 de diciembre de 2008. Conjugados de PEG-lípido aún adicionales adecuados para su uso en la invención incluyen, sin limitación, 1-[8'-(1,2-dimiristil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbomoi- ω -metil-poli(etilenglicol) (2KPEG-DMG). La síntesis de 2KPEG-DMG se describe en la patente de EE.UU. N.º 7.404.969.

El resto de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento pueden comprender un peso molecular promedio que oscila de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En ciertos casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente el 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, etc.). En realizaciones preferidas, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons o aproximadamente 750 daltons.

En algunas realizaciones, el conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas es un CPL que tiene la fórmula: A-W-Y, en la que A es un resto de lípido, W es un polímero hidrófilo e Y es un resto policationico. W puede ser un polímero seleccionado del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), poliamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, o combinaciones de los mismos, el polímero que tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 7000 daltons. En algunas realizaciones, Y tiene al menos 4 cargas positivas a un pH seleccionado. En algunas realizaciones, Y puede ser lisina, arginina, asparagina, glutamina, derivados de los mismos, o combinaciones de los mismos.

En ciertos casos, el conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas (por ejemplo, conjugado de PEG-

lípidos) puede comprender de aproximadamente el 0,1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles, de aproximadamente el 0,5 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles, de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles, de aproximadamente el 0,6 % en moles a aproximadamente el 1,9 % en moles, de aproximadamente el 0,7 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 0,8 % en moles a aproximadamente el 1,7 % en moles, de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 1,2 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 1,2 % en moles a aproximadamente el 1,7 % en moles, de aproximadamente el 1,3 % en moles a aproximadamente el 1,6 % en moles, de aproximadamente el 1,4 % en moles a aproximadamente el 1,5 % en moles, o aproximadamente el 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 o el 2 % en moles (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) del lípido total presente en la partícula.

En las partículas de lípido descritas en el presente documento, el agente activo o agente terapéutico puede ser completamente encapsulado dentro de la porción de lípido de la partícula, protegiendo así el agente activo o agente terapéutico de la degradación enzimática. En realizaciones preferidas, un SNALP que comprende un ácido nucleico tal como un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) está completamente encapsulado dentro de la porción de lípido de la partícula, protegiendo así el ácido nucleico de la degradación por nucleasas. En ciertos casos, el ácido nucleico en el SNALP no es sustancialmente degradado después de exposición de la partícula a una nucleasa a 37 °C durante al menos aproximadamente 20, 30, 45 o 60 minutos. En ciertos otros casos, el ácido nucleico en el SNALP no es sustancialmente degradado 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 agente activo o agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico tal como ARNip) se compleja con la porción de lípido de la partícula. Uno de los beneficios de las formulaciones descritas en el presente documento es que las composiciones de partículas de lípido son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos tales como los seres humanos.

El término "completamente encapsulado" indica que el agente activo o agente terapéutico en la partícula de lípido no se degrada significativamente después de la exposición a suero o un ensayo de nucleasa o proteasa que degradaría significativamente el ADN libre, ARN, o proteína. En un sistema completamente encapsulado, preferentemente menos de aproximadamente el 25 % del agente activo o agente terapéutico en la partícula se degrada en un tratamiento que normalmente degradaría el 100 % del agente activo libre o agente terapéutico, más preferentemente se degrada menos de aproximadamente el 10 %, y lo más preferentemente menos de aproximadamente el 5 % del agente activo o agente terapéutico en la partícula. En el contexto de agentes terapéuticos de ácido nucleico, la encapsulación completa puede determinarse por un ensayo Oligreen®. Oligreen® es una tinción de ácido nucleico fluorescente ultra-sensible para cuantificar oligonucleótidos y ADN monocatenario o ARN en solución (disponible de Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA). "Completamente encapsulado" también indica que las partículas de lípido son estables en suero, es decir, que no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras la administración *in vivo*.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición de partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) que comprende una pluralidad de partículas de lípido. En realizaciones preferidas, el agente activo o agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) está completamente encapsulado dentro de la porción de lípido de las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP), de forma que de aproximadamente el 30 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 90 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 %, de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 %, de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior) de las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) tienen el agente activo o agente terapéutico encapsulado en ellas.

Normalmente, las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) descritas en el presente documento tienen una relación de lípido:agente activo (por ejemplo, lípido:ácido nucleico) (relación masa/masa) de aproximadamente 1 a aproximadamente 100. En algunos casos, la relación de lípido:agente activo (por ejemplo, lípido:ácido nucleico) (relación masa/masa) oscila de aproximadamente 1 a aproximadamente 50, de aproximadamente 2 a aproximadamente 25, de aproximadamente 3 a aproximadamente 20, de aproximadamente 4 a aproximadamente 15, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. En realizaciones preferidas, las partículas de lípido descritas en el presente documento tienen una relación de lípido:agente activo (por ejemplo, lípido:ácido nucleico) (relación masa/masa) de aproximadamente 5 a aproximadamente 15, por ejemplo, aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior).

Normalmente, las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) descritas en el presente documento tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm. En realizaciones preferidas, las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) descritas en el presente documento tienen un diámetro medio de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 80 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 120 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, o menos de aproximadamente 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm o 80 nm (o cualquier fracción de los mismos o intervalo en su interior).

En una realización específica de la presente divulgación, la SNALP comprende: (a) uno o más ARN interferentes no modificados y/o modificados (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN) que silencian la expresión del gen diana; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 56,5 % en moles a aproximadamente el 66,5 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 31,5 % en moles a aproximadamente el 42,5 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización específica de SNALP se denomina generalmente en el presente documento la formulación "1:62". En una realización preferida, el lípido catiónico es DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), el lípido no catiónico es colesterol, y el conjugado de lípido es un conjugado de PEG-DAA. Aunque éstas son realizaciones preferidas de la formulación 1:62, aquellos expertos en la materia apreciarán que pueden usarse otros lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos (incluyendo otros derivados de colesterol) y lípidos conjugados en la formulación 1:62 como se describe en el presente documento.

En una realización específica de la invención, la SNALP comprende: (a) uno o más ARN interferentes no modificados y/o modificados (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN) que silencian la expresión del gen diana; (b) un lípido catiónico que comprende de aproximadamente el 52 % en moles a aproximadamente el 62 % en moles del lípido total presente en la partícula; (c) un lípido no catiónico que comprende de aproximadamente el 36 % en moles a aproximadamente el 47 % en moles del lípido total presente en la partícula; y (d) un conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas que comprende de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles del lípido total presente en la partícula. Esta realización específica de SNALP se denomina generalmente en el presente documento la formulación "1:57". En una realización preferida, el lípido catiónico es DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido (tal como DPPC) y colesterol, en la que el fosfolípido comprende de aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 9 % en moles del lípido total presente en la partícula (por ejemplo, aproximadamente 7,1 % en moles) y el colesterol (o derivado de colesterol) comprende de aproximadamente el 32 % en moles a aproximadamente el 37 % en moles del lípido total presente en la partícula (por ejemplo, aproximadamente 34,3 % en moles), y PEG-lípido es un PEG-DAA (por ejemplo, PEG-cDMA). En otra realización preferida, el lípido catiónico es DLinDMA o DLin-K-C2-DMA ("XTC2"), el lípido no catiónico es una mezcla de un fosfolípido (tal como DPPC) y colesterol, en la que el fosfolípido comprende de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles del lípido total presente en la partícula (por ejemplo, aproximadamente 20 % en moles) y el colesterol (o derivado de colesterol) comprende de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles del lípido total presente en la partícula (por ejemplo, aproximadamente 20 % en moles), y PEG-lípido es un PEG-DAA (por ejemplo, PEG-cDMA). Aunque éstas son realizaciones preferidas de la formulación 1:57, aquellos expertos en la materia apreciarán que pueden usarse otros lípidos catiónicos, lípidos no catiónicos (incluyendo otros fosfolípidos y otros derivados de colesterol), y lípidos conjugados en la formulación 1:57 como se describe en el presente documento.

En realizaciones preferidas, la formulación 1:62 de SNALP es un sistema de tres componentes que está libre de fosfolípido y comprende aproximadamente 1,5 % en moles de PEG-cDMA (o PEG-cDSA), aproximadamente 61,5 % en moles de DLinDMA (o XTC2) y aproximadamente 36,9 % en moles de colesterol (o derivado del mismo). En otras realizaciones preferidas, la formulación 1:57 de SNALP es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 1,4 % en moles de PEG-cDMA (o PEG-cDSA), aproximadamente 57,1 % en moles de DLinDMA (o XTC2), aproximadamente 7,1 % en moles de DPPC y aproximadamente 34,3 % en moles de colesterol (o derivado del mismo). En aún otras realizaciones preferidas, la formulación 1:57 de SNALP es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 1,4 % en moles de PEG-cDMA (o PEG-cDSA), aproximadamente 57,1 % en moles de DLinDMA (o XTC2), aproximadamente 20 % en moles de DPPC y aproximadamente 20 % en moles de colesterol (o derivado del mismo). Debe entenderse que estas formulaciones de SNALP son formulaciones objetivo, y que la cantidad de lípido (tanto catiónico como no catiónico) presente y la cantidad de conjugado de lípido presente en las formulaciones de SNALP puede variar.

La presente divulgación también proporciona una composición farmacéutica que comprende una partícula de lípido (por ejemplo, SNALP) descrita en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método de introducción de uno o más agentes

activos o agentes terapéuticos (por ejemplo, ácido nucleico) en una célula, que comprende poner en contacto la célula con una partícula de lípido (por ejemplo, SNALP) descrita en el presente documento. En una realización, la célula está en un mamífero y el mamífero es un ser humano. En otra realización, la presente divulgación proporciona un método para la administración *in vivo* de uno o más agentes activos o agentes terapéuticos (por ejemplo, ácido nucleico), que comprende administrar a un sujeto mamífero una partícula de lípido (por ejemplo, SNALP) descrita en el presente documento. En una realización preferida, el modo de administración incluye, pero no se limita a, oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intrarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea y intradérmica. Preferentemente, el sujeto mamífero es un ser humano.

En una realización, al menos aproximadamente el 5 %, 10 %, 15 %, 20 % o el 25 % de la dosis total inyectada de las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) está presente en plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En otras realizaciones, más de aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 % y tanto como aproximadamente el 60 %, 70 % o el 80 % de la dosis total inyectada de las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) está presente en plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En ciertos casos, más de aproximadamente el 10 % de una pluralidad de las partículas está presente en el plasma de un mamífero aproximadamente 1 hora después de la administración. En ciertos otros casos, la presencia de las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) es detectable al menos aproximadamente 1 hora después de la administración de la partícula. En ciertas realizaciones, la presencia de un agente activo o agente terapéutico tal como un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) es detectable en células de pulmón, hígado, tumor, o en un sitio de inflamación aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras realizaciones, la regulación por disminución de la expresión de una secuencia diana por un agente activo o agente terapéutico, tal como un ARN interferente (por ejemplo, ARNip), es detectable aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En aún otras realizaciones, la regulación por disminución de la expresión de una secuencia diana por un agente activo o agente terapéutico, tal como un ARN interferente (por ejemplo, ARNip), se produce preferencialmente en células tumorales o en células en un sitio de inflamación. En realizaciones adicionales, la presencia o efecto de un agente activo o agente terapéutico tal como un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) en células en un sitio proximal o distal al sitio de administración o en células del pulmón, hígado, o un tumor, es detectable aproximadamente el 12, 24, 48, 72 o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 o 28 días después de la administración. En realizaciones adicionales, las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) se administran por vía parenteral o por vía intraperitoneal.

En algunas realizaciones, las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) son particularmente útiles en métodos para la administración terapéutica de uno o más ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ARN interferente (por ejemplo, ARNip). En particular, es un objeto de la presente divulgación proporcionar métodos *in vitro* y *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 por disminución o silenciando la transcripción y/o traducción de una o más secuencias de ácidos nucleicos diana o genes de interés. Como ejemplo no limitante, los métodos descritos en el presente documento son útiles para la administración *in vivo* de ARN interferente (por ejemplo, ARNip) al hígado y/o tumor de un sujeto mamífero. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociada a la expresión y/o expresión en exceso de un gen y la expresión o expresión en exceso del gen se reducen por el ARN interferente (por ejemplo, ARNip). En ciertas otras realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula de lípido (por ejemplo, SNALP) puede administrarse al mamífero. En algunos casos, un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) se formula en una SNALP, y las partículas se administran a pacientes que requieren tal tratamiento. En otros casos, se eliminan células de un paciente, el ARN interferente (por ejemplo, ARNip) se administra *in vitro* (por ejemplo, usando una SNALP descrita en el presente documento), y las células se reinyectado en el paciente.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) que comprende moléculas de ARN interferente asimétrico (ARNia) que silencian la expresión de un gen diana y métodos de uso de tales partículas para silenciar la expresión del gen diana.

En una realización, la molécula de ARNia comprende una región bicatenaria (dúplex) de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 nucleótidos (de pares de bases) de longitud, en la que la molécula de ARNia comprende una hebra no codificante que comprende nucleótidos protuberantes en 5' y 3', y en la que la molécula de ARNia es capaz de silenciar la expresión del gen diana.

En ciertos casos, la molécula de ARNia comprende una región bicatenaria (dúplex) de aproximadamente 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 o 14-17 nucleótidos (de pares de bases) de longitud, más normalmente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos (de pares de bases) de longitud. En ciertos otros casos, los nucleótidos protuberantes en 5' y 3' en la hebra no codificante comprenden secuencias que son complementarias a la secuencia de ARN diana, y pueden comprender opcionalmente además secuencias no de direccionamiento. En algunas realizaciones, cada uno de los nucleótidos protuberantes en 5' y 3' en la hebra no codificante comprende o consiste en uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más nucleótidos.

En otras realizaciones, la molécula de ARNia comprende nucleótidos modificados seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe, nucleótidos de 2'F, 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-MOE, nucleótidos

de LNA, y mezclas de los mismos. En una realización preferida, la molécula de ARNia comprende nucleótidos de 2'OMe. Como ejemplo no limitante, los nucleótidos de 2'OMe pueden seleccionarse del grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

- 5 En un aspecto relacionado, la presente divulgación proporciona partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) que comprenden moléculas de microARN (miARN) que silencian la expresión de un gen diana y métodos de uso de tales composiciones para silenciar la expresión del gen diana.

10 En una realización, la molécula de miARN comprende aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, en la que la molécula de miARN es capaz de silenciar la expresión del gen diana.

15 En ciertos casos, la molécula de miARN comprende aproximadamente 15-50, 15-40 o 15-30 nucleótidos de longitud, más normalmente aproximadamente 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, y tiene preferentemente aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud. En una realización preferida, la molécula de miARN es una molécula de miARN madura que se dirige a una secuencia de ARN de interés.

20 En algunas realizaciones, la molécula de miARN comprende nucleótidos modificados seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe, nucleótidos de 2'F, 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-MOE, nucleótidos de LNA, y mezclas de los mismos. En una realización preferida, la molécula de miARN comprende nucleótidos de 2'OMe. Como ejemplo no limitante, los nucleótidos de 2'OMe pueden seleccionarse del grupo que consiste en nucleótidos de 2'OMe-guanosina, nucleótidos de 2'OMe-uridina, y mezclas de los mismos.

25 Como tales, las partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) son ventajosas y adecuadas para su uso en la administración de agentes activos o agentes terapéuticos tales como ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente tal como ARNip, ARNia y/o miARN) a un sujeto (por ejemplo, un mamífero tal como un ser humano) debido a que son estables en circulación, de un tamaño requerido para el comportamiento farmacodinámico produciendo acceso a sitios extravasculares, y son capaces de llegar a las poblaciones de células diana.

30 IV. Agentes activos

Los agentes activos (por ejemplo, agentes terapéuticos) incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado sobre una célula, tejido, órgano o sujeto. Tales efectos pueden ser, por ejemplo, biológicos, fisiológicos y/o cosméticos. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto que incluye, pero no se limita a, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, moléculas pequeñas, y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ARN interferente (por ejemplo, ARNip, ARNia, miARN), oligonucleótidos antisentido, plásmidos, ribozimas, oligonucleótidos inmunoestimulantes, y mezclas de los mismos. Ejemplos de péptidos o polipéptidos incluyen, sin limitación, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes, anticuerpos Primatized™), 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. Ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a, moléculas orgánicas pequeñas o compuestos tales como cualquier agente o fármaco convencional conocido para aquellos expertos en la materia.

45 En algunas realizaciones, el agente activo es un agente terapéutico, o una sal o derivado del mismo. Los derivados de agente terapéutico pueden ser ellos mismos terapéuticamente activos o pueden ser profármacos, que llegan a ser activos tras la modificación adicional. Así, en una realización, un derivado de agente terapéutico retiene alguna o toda 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 llega a ser activo tras la modificación adicional.

50 A. Ácidos nucleicos

55 En ciertas realizaciones, las partículas de lípido de la presente divulgación están asociadas con un ácido nucleico, produciendo una partícula de ácido nucleico-lípido (por ejemplo, SNALP). En algunas realizaciones, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula de lípido. Como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido, conteniendo los fragmentos hasta 60 nucleótidos generalmente denominados oligonucleótidos, y fragmentos más largos denominados polinucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos son de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico puede administrarse solo en las partículas de lípido descritas en el presente documento, o en combinación (por ejemplo, co-administrarse) con partículas de lípido que comprenden péptidos, polipéptidos, o moléculas pequeñas tales como fármacos convencionales.

65 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 que existen de forma natural, azúcares y enlaces interazúcar (esqueleto). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen

polímeros u oligómeros que comprenden monómeros que no existen de forma natural, o porciones de los mismos, que funcionan similarmente. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos son formas frecuentemente preferidas con respecto a las nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, inmunogenicidad reducida y elevada estabilidad en presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos se clasifican generalmente como desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos. Un desoxirribonucleótido consiste en un azúcar de 5 carbonos denominado desoxirribosa unido covalentemente con fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero no ramificado alternante. Un ribonucleótido consiste en una estructura de repetición similar donde el azúcar de 5 carbonos es ribosa.

El ácido nucleico que está presente en una partícula de lípido-ácido nucleico según la presente divulgación incluye cualquier forma de ácido nucleico que sea conocida. Los ácidos nucleicos usados en el presente documento pueden ser ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario, o híbridos de ADN-ARN. Ejemplos de ADN bicatenario se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y de terminación, y sistemas auto-replicantes tales como ADN vírico o de plásmido. Ejemplos de ARN bicatenario se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, ARNip y otros agentes de iARN tales como ARNia y pre-miARN. Ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, miARN maduro y oligonucleótidos de formación de triplex.

Los ácidos nucleicos pueden ser de diversas longitudes, generalmente dependientes de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden ser de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 restos de nucleótidos de longitud. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden oscilar de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En diversas realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, tanto monocatenarios, bicatenarios, como de hebra triple, pueden oscilar en longitud 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) se hibrida específicamente con o es complementario a una secuencia de polinucleótidos diana. Los términos "específicamente hibridable" y "complementario", como se usan en el presente documento, indican un grado de complementariedad suficiente tal que se produce unión estable y específica entre la diana de ADN o ARN y el oligonucleótido. Se entiende que un oligonucleótido no necesita ser el 100 % complementario a su secuencia de ácidos nucleicos diana para ser específicamente hibridable. En realizaciones preferidas, un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la secuencia diana interfiere con la función normal de la secuencia diana para producir una pérdida de utilidad o expresión de la misma, y hay un grado de complementariedad suficiente para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que la unión específica se desea, es decir, bajo condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que los ensayos se realizan. Así, el oligonucleótido puede incluir 1, 2, 3, o más sustituciones de bases en comparación con la región de un gen o secuencia de ARNm que está siendo elegida como diana o con la que se hibrida específicamente.

1. ARNip

Un componente de ARNip de una partícula de ácido nucleico-lípido de la presente invención es capaz de silenciar la expresión de un gen diana de interés. Cada hebra del dúplex de ARNip normalmente tiene aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, preferentemente aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, el ARNip comprende al menos un nucleótido modificado. El ARNip modificado es generalmente menos inmunoestimulante que una secuencia de ARNip no modificado correspondiente y retiene actividad de iARN contra el gen diana de interés. En algunas realizaciones, el ARNip 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. En realizaciones preferidas, uno o más de los nucleótidos de uridina y/o guanosina se modifican. Los nucleótidos modificados pueden estar presentes en una hebra (es decir, codificante o no codificante) o ambas hebras del ARNip. La secuencias de ARNip puede tener nucleótidos protuberantes (por ejemplo, nucleótidos protuberantes en 3' o 5' como se describen en Elbashir et al., Genes Dev., 15:188 (2001) o Nykänen et al., Cell, 107:309 (2001)), o pueden carecer de nucleótidos protuberantes (es decir, tener extremos romos).

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

En algunas realizaciones, menos de aproximadamente el 25 % (por ejemplo, menos de aproximadamente el 25 %,

24 %, 23 %, 22 %, 21 %, 20 %, 19 %, 18 %, 17 %, 16 %, 15 %, 14 %, 13 %, 12 %, 11 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % o el 1 %) de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

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

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

a. Selección de secuencias de ARNip

- 35 Pueden identificarse secuencias de ARNip adecuadas usando cualquier medio conocido en la técnica. Normalmente, los métodos descritos en Elbashir et al., *Nature*, 411:494-498 (2001) y Elbashir et al., *EMBO J.*, 20:6877-6888 (2001) se combinan con las reglas de diseño racional expuestas en Reynolds et al., *Nature Biotech.*, 22(3):326-330 (2004).
- 40 Generalmente, la secuencia de nucleótidos 3' del codón de iniciación AUG de un transcrito del gen diana de interés es barrido para secuencias de dinucleótidos (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' a las secuencias de dinucleótidos se identifican como posibles secuencias de ARNip (es decir, una secuencia diana o una secuencia de hebra codificante). Normalmente, los 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, o más nucleótidos inmediatamente 3' a las
- 45 secuencias de dinucleótidos se identifican como posibles secuencias de ARNip. En algunas realizaciones, la secuencia de dinucleótidos es una secuencia de AA o NA y los 19 nucleótidos inmediatamente 3' al dinucleótido AA o NA se identifican como posibles secuencias de ARNip. Las secuencias de ARNip están normalmente separadas en diferentes posiciones a lo largo de la longitud del gen diana. Para potenciar adicionalmente la eficiencia de silenciamiento de las secuencias de ARNip, pueden analizarse posibles secuencias de ARNip para identificar sitios
- 50 que no contienen regiones de homología con otras secuencias codificantes, por ejemplo, en la célula diana u organismo. Por ejemplo, una secuencia de ARNip adecuada de aproximadamente 21 pares de bases normalmente no tendrá más de 16-17 pares de bases contiguos de homología con secuencias codificantes en la célula diana u organismo. Si las secuencias de ARNip van a expresarse a partir de un promotor Pol III de ARN, se seleccionan las secuencias de ARNip que carecen de más de 4 A o T contiguas.

- 55 Una vez se ha identificado una posible secuencia de ARNip, puede diseñarse una secuencia complementaria (es decir, una secuencia de hebra no codificante). También puede analizarse una posible secuencia de ARNip usando una variedad de criterios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para potenciar su eficiencia de silenciamiento, las secuencias de ARNip pueden analizarse por un algoritmo de diseño racional para identificar secuencias que tienen
- 60 una o más de las siguientes características: (1) 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) sin repeticiones internas; (4) una A en la posición 19 de la hebra codificante; (5) una A en la posición 3 de la hebra codificante; (6) un U en la posición 10 de la hebra codificante; (7) sin G/C en la posición 19 de la hebra codificante; y (8) sin G en la posición 13 de la hebra codificante. Las herramientas de diseño de ARNip que incorporan algoritmos que asignan valores
- 65 adecuados de cada una de estas características y son útiles para la selección de ARNip pueden encontrarse en, por ejemplo, <http://boz094.ust.hk/iARN/siRNA>. Un experto en la materia apreciará que secuencias con una o más de las

características anteriores pueden seleccionarse para análisis y prueba adicionales como posibles secuencias de ARNip.

Adicionalmente, las posibles secuencias de ARNip con uno o más de los siguientes criterios pueden eliminarse frecuentemente como ARNip: (1) secuencias que comprenden un tramo de 4 o más de la misma base en una fila; (2) secuencias que comprenden homopolímeros de G (es decir, para reducir posibles efectos no específicos debidos a características estructurales de estos polímeros); (3) secuencias que comprenden motivos de base triple (por ejemplo, GGG, CCC, AAA o TTT); (4) secuencias que comprenden tramos de 7 o más G/C en una fila; y (5) secuencias que comprenden repeticiones directas de 4 o más bases dentro de los candidatos produciendo estructuras de pliegue hacia abajo internas. Sin embargo, un experto en la materia apreciará que secuencias con una o más de las anteriores características pueden todavía seleccionarse para análisis y prueba adicionales como posibles secuencias de ARNip.

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

Una vez se ha identificado una posible secuencia de ARNip, la secuencia puede analizarse para la presencia de cualquier propiedad inmunoestimulante, por ejemplo, usando un ensayo de citocinas *in vitro* o un modelo animal *in vivo*. Motivos en la hebra codificante y/o no codificante de la secuencia de ARNip, tales como motivos ricos en GU (por ejemplo, 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3', etc.), también pueden proporcionar una indicación de si la secuencia puede ser inmunoestimulante. Una vez se encuentra que una molécula de ARNip es inmunoestimulante, puede entonces modificarse para reducir sus propiedades inmunoestimulantes como se describe en el presente documento. Como ejemplo no limitante, una secuencia de ARNip puede ponerse en contacto con una célula respondedora de mamífero en condiciones tales que la célula produzca una respuesta inmunitaria detectable para determinar si el ARNip es un ARNip inmunoestimulante o no inmunoestimulante. La célula respondedora de mamífero puede ser de un mamífero intacto (es decir, un mamífero que no ha estado previamente en contacto con el producto génico de la secuencia de ARNip). La célula respondedora de mamífero puede ser, por ejemplo, una célula mononuclear de sangre periférica (CMSP), un macrófago, y similares. La respuesta inmunitaria detectable puede comprender la producción de una citocina o factor de crecimiento tal como, por ejemplo, TNF- α , IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-6, IL-12, o una combinación de los mismos. Una molécula de ARNip identificada como que es inmunoestimulante puede entonces modificarse para reducir sus propiedades inmunoestimulantes 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 el 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, o el 5 %) de los nucleótidos en la región bicatenaria del dúplex de ARNip pueden sustituirse con nucleótidos modificados tales como nucleótidos de 2'OMe. El ARNip modificado puede entonces ponerse en contacto con una célula respondedora de mamífero como se ha descrito anteriormente para confirmar que sus propiedades inmunoestimulantes han sido reducidas o suprimidas.

Ensayos *in vitro* adecuados para detectar una respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a, la técnica de inmunoensayo de sándwich de anticuerpo monoclonal doble de David et al. (patente de EE.UU. N.º 4.376.110); ensayos de sándwich de anticuerpo monoclonal-policlonal Wide et al., en Kirkham and Hunter, eds., Radioimmunoassay Methods, E. and S. Livingstone, Edinburgh (1970)); el método de "transferencia Western" de Gordon et al. (patente de EE.UU. N.º 4.452.901); inmunoprecipitación de ligando marcado (Brown et al., J. Biol. Chem., 255:4980-4983 (1980)); enzoinmunoanálisis de adsorción (ELISA) como se describen, por ejemplo, por Raines et al., J. Biol. Chem., 257:5154-5160 (1982); técnicas inmunocitoquímicas, que incluyen el uso de fluorocromos (Brooks et al., Clin. Exp. Immunol., 39:477 (1980)); y neutralización de actividad (Bowen-Pope et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:2396-2400 (1984)). Además de los inmunoensayos descritos anteriormente, están disponibles varios otros inmunoensayos, que incluyen aquellos descritos en las patentes de EE.UU. 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 de ratón *in vivo* como se describe en, por ejemplo, Judge et al., Mol. Ther., 13:494-505 (2006). En ciertas realizaciones, el ensayo puede realizarse del siguiente modo: (1) puede administrarse ARNip por inyección intravenosa estándar en la vena lateral de la cola; (2) puede recogerse sangre por punción cardíaca aproximadamente 6 horas después de la administración y procesarse como plasma para análisis de citocinas; y (3) pueden cuantificarse citocinas usando kits de ELISA de sándwich según las instrucciones del fabricante (por ejemplo, IFN- α de ratón y humano (PBL Biomedical; Piscataway, NJ); IL-6 y TNF- α humanos (eBioscience; San Diego, CA); e IL-6, TNF- α e IFN- γ de ratón (BD Biosciences; San Diego, CA)).

Están comercialmente disponibles anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a citocinas y factores de

crecimiento de múltiples fuentes y pueden generarse usando métodos conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256: 495-497 (1975) y Harlow y Lane, *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publication, New York (1999)). La generación de anticuerpos monoclonales ha sido previamente descrita y puede llevarse a cabo mediante cualquier medio conocido en la técnica (Buhring et al., en *Hybridoma*, Vol. 10, N.º 1, pp. 77-78 (1991)). En algunos métodos, el anticuerpo monoclonal se marca (por ejemplo, con cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos o químicos) para facilitar la detección.

b. Generación de moléculas de ARNip

Puede proporcionarse ARNip en varias formas que incluyen, por ejemplo, como uno o más dúplex de ARN interferente pequeño (ARNip) aislados, como ARN bicatenario (ARNbc) más largo, o como ARNip o ARNbc transcrito de un casete transcripcional en un plásmido de ADN. Las secuencias de ARNip pueden tener nucleótidos protuberantes (por ejemplo, nucleótidos protuberantes en 3' o 5' como se describe en Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15:188 (2001) o Nykänen et al., *Cell*, 107:309 (2001), o pueden carecer de nucleótidos protuberantes (es decir, para tener extremos romos).

Puede usarse una población de ARN para proporcionar ARN de precursor largos, o ARN de precursor largos que tienen identidad sustancial o completa con una secuencia diana seleccionada, para preparar los ARNip. Los ARN pueden aislarse de células o tejido, sintetizarse y/o clonarse según métodos muy conocidos para aquellos expertos en la materia. El ARN puede ser una población mixta (obtenida de células o tejido, transcrita de ADNc, sustraída, seleccionada, etc.), o puede representar una única secuencia diana. El ARN puede ser que exista de forma natural (por ejemplo, aislado de muestras tisulares o de células), sintetizarse *in vitro* (por ejemplo, usando T7 o SP6 polimerasa y productos de PCR o un ADNc clonado), o sintetizarse químicamente.

Para formar un ARNbc largo, para ARN sintéticos, el complemento también se transcribe *in vitro* y se hibrida para formar un ARNbc. Si se usa una población de ARN que existe de forma natural, también se proporcionan complementos de ARN (por ejemplo, para formar ARNbc para la digestión por RNasa III de *E. coli* o Dicer), por ejemplo, por transcripción de ADNc correspondientes a la población de ARN, o usando ARN polimerasas. Los ARN de precursor se hibridan entonces para formar ARN bicatenarios para la digestión. Los ARNbc pueden ser directamente administrados a un sujeto o pueden digerirse *in vitro* antes de la administración.

Métodos de aislamiento de ARN, síntesis de ARN, hibridación de ácidos nucleicos, preparación y cribado de bibliotecas de ADNc, y realización de PCR, son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Gubler y Hoffman, *Gene*, 25:263-269 (1983); Sambrook et al., arriba; Ausubel et al., arriba), ya que son los métodos de PCR (véanse las patentes de EE.UU. 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 muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Textos básicos adicionales que desvelan los métodos generales de uso en 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).

Preferentemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los oligonucleótidos que comprenden las moléculas de ARNip descritas en el presente documento pueden sintetizarse usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, 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 hace uso de grupos de protección y acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosoramiditos en el extremo 3'. Como ejemplo no limitante, pueden realizarse síntesis a pequeña escala en un sintetizador de Applied Biosystems usando un protocolo a escala de 0,2 µmoles. Alternativamente, pueden realizarse síntesis a la escala de 0,2 µmoles en un sintetizador de placa de 96 pocillos de Protogene (Palo Alto, CA). Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente divulgación una escala más grande o más pequeña de síntesis. Reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, métodos para la desprotección de ARN y métodos para la purificación de ARN son conocidos para aquellos expertos en la materia.

También pueden sintetizarse moléculas de ARNip mediante una técnica de síntesis en tándem, en la que ambas cadenas se sintetizan como un único fragmento de oligonucleótidos continuo o hebra separada por un conector escindible que es posteriormente escindido para proporcionar fragmentos separados o hebras que se hibridan para formar el dúplex de ARNip. El conector puede ser un conector de polinucleótido o un conector de no nucleótido. La síntesis de ARNip en tándem puede ser fácilmente adaptada a tanto plataformas de síntesis multi-pocillo/multi-placa, además de plataformas de síntesis a gran escala empleando reactores discontinuos, columnas de síntesis, y similares. Alternativamente, pueden ensamblarse moléculas de ARNip a partir de dos oligonucleótidos distintos, en los que un oligonucleótido comprende la hebra codificante y el otro comprende la hebra no codificante del ARNip. Por ejemplo, cada hebra puede sintetizarse por separado y unirse juntas por hibridación o ligación tras la síntesis y/o desprotección. En ciertos otros casos, las moléculas de ARNip pueden sintetizarse como un único fragmento de oligonucleótido continuo, donde las regiones codificantes y no codificantes auto-complementarias se hibridan para formar un dúplex de ARNip que tiene estructura secundaria de horquilla.

c. Modificación de secuencias de ARNip

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

Ejemplos de nucleótidos modificados adecuados para su uso en la invención incluyen, pero no se limitan a, ribonucleótidos que tienen un grupo 2'-O-metilo (2'OMe), 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), 2'-desoxi, 5-C-metilo, 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), 4'-tio, 2'-amino o 2'-C-alilo. Nucleótidos modificados que tienen una conformación Northern tal 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 ARNip. Tales nucleótidos modificados incluyen, sin limitación, nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) (por ejemplo, nucleótidos de 2'-O, 4'-C-metileno-(D-ribofuranosilo), nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos de 2'-metil-tio-etilo, nucleótidos de 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), nucleótidos de 2'-desoxi-2'-cloro (2'Cl) y 2'-azido-nucleótidos. En ciertos casos, las moléculas de ARNip descritas en el presente documento incluyen uno o más nucleótidos de abrazadera en G. Un nucleótido de abrazadera en G se refiere a un análogo de citosina modificado en el que las modificaciones confieren la capacidad al enlace de hidrógeno tanto de caras de Watson-Crick como de Hoogsteen de un nucleótido de guanina complementario dentro de 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 nucleótido tal como, por ejemplo, C-fenilo, C-naftilo, otros derivados aromáticos, inosina, azolcarboxamidas 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 moléculas de ARNip.

En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNip pueden comprender además una o más modificaciones químicas tales como resto de terminación terminal, modificaciones del esqueleto de fosfato, y similares. Ejemplos de restos de terminación terminales incluyen, sin limitación, restos abásicos desoxi invertidos, modificaciones de glicerilo, nucleótidos de 4',5'-metileno, nucleótidos de 1-(β-D-eritrofuranosilo), 4'-tio-nucleótidos, nucleótidos carbocíclicos, nucleótidos de 1,5-anhidrohexitol, L-nucleótidos, α-nucleótidos, nucleótidos de base modificada, nucleótidos de *treo*-pentofuranosilo, 3',4'-seco-nucleótidos acíclicos, nucleótidos de 3,4-dihidroxibutilo acíclicos, nucleótidos de 3,5-dihidroxipentilo acíclicos, 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 de 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-aminododecilo, fosfato de hidroxipropilo, fosfato de 1,4-butanodiol, 3'-fosforamidato, 5'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexilfosfato, 3'-fosfato, 5'-amino, 3'-fosforotioato, 5'-fosforotioato, fosforoditioato, y metilfosfonato de enlace o no enlace o restos de 5'-mercapto (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.998.203; Beaucage et al., *Tetrahedron* 49:1925 (1993)). Ejemplos no limitantes de modificaciones del esqueleto de fosfato (es decir, que producen enlaces internucleotídicos modificados) incluyen sustituciones de fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato, carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y alquilsililo (véase, por ejemplo, Hunziker et al., *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties*, en *Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker et al., *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides*, en *Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39 (1994)). Tales modificaciones químicas pueden producirse en el extremo 5' y/o extremo 3' de la hebra codificante, hebra no codificante, o ambas hebras del ARNip.

En algunas realizaciones, la hebra codificante y/o no codificante de la molécula de ARNip puede comprender además un nucleótido protuberante en 3' que tiene aproximadamente 1 a aproximadamente 4 (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4) 2'-desoxirribonucleótidos y/o cualquier combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Ejemplos adicionales de nucleótidos modificados y tipos de modificaciones químicas que pueden introducirse en las moléculas de ARNip se describen, por ejemplo, en la patente de RU N.º GB 2.397.818 B y las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20040192626, 20050282188 y 20070135372.

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

En otras realizaciones, la modificación química del ARNip comprende unir un conjugado a la molécula de ARNip. El conjugado puede unirse en el extremo 5' y/o 3' de la hebra codificante y/o no codificante del ARNip mediante una

unión covalente tal como, por ejemplo, un conector biodegradable. El conjugado también puede unirse al ARNip, por ejemplo, mediante un grupo carbamato u otro grupo de enlace (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20050074771, 20050043219 y 20050158727). En ciertos casos, el conjugado es una molécula que facilita la administración del ARNip en una célula. Ejemplos de moléculas de conjugado adecuadas para la unión a ARNip incluyen, sin limitación, esteroides tales como colesterol, glicoles tales como polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humano (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-acetilgalactosamina, glucosa, manosa, fructosa, fucosa, etc.), fosfolípidos, péptidos, ligandos para receptores celulares capaces de mediar en la captación celular, y combinaciones de los mismos (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. 20030130186, 20040110296 y 20040249178; la patente de EE.UU. N.º 6.753.423). Otros ejemplos incluyen el resto lipófilo, vitamina, polímero, péptido, proteína, ácido nucleico, molécula pequeña, oligosacárido, agrupación de hidratos de carbono, intercalador, ligando del surco menor, agente de escisión, y las moléculas de conjugado de agente de reticulación descritas en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20050119470 y 20050107325. Aún otros ejemplos incluyen la 2'-O-alkuilamina, 2'-O-alcóxialquilamina, poliamina, pirimidina modificada con C5-catiónico, péptido catiónico, grupo guanidinio, grupo amidinio, moléculas de conjugado de aminoácido catiónico descritas en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20050153337. Ejemplos adicionales incluyen el grupo hidrófobo, compuesto activo de membrana, compuesto penetrante en célula, señal que se dirige a célula, modificador de la interacción y moléculas de conjugado de estabilizador estérico descritas en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20040167090. Ejemplos adicionales incluyen las moléculas de conjugado descritas en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20050239739. El tipo de conjugado usado y el grado de conjugación con la molécula de ARNip pueden evaluarse para perfiles farmacocinéticos mejorados, biodisponibilidad y/o estabilidad del ARNip, mientras que se retiene la actividad de iARN. Como tal, un experto en la materia puede cribar moléculas de ARNip que tienen diversos conjugados unidos a las mismas para identificar aquellas que tienen propiedades mejoradas y actividad de iARN completa usando cualquiera de una variedad de modelos de cultivo celular *in vitro* o animales *in vivo* muy conocidos.

d. Genes diana

El componente de ARNip de las partículas de ácido nucleico-lípido descrito en el presente documento puede usarse para regular por disminución o silenciar la traducción (es decir, expresión) de un gen de interés. Genes de interés incluyen, pero no se limitan a, genes asociados a infección vírica y supervivencia, genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedades y trastornos del hígado), genes asociados a tumorigénesis y transformación celular (por ejemplo, cáncer), genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como aquellos asociados a respuestas inflamatorias y auto-inmunitarias, genes de receptor de ligando, y genes asociados a trastornos neurodegenerativos.

Genes asociados a infección vírica y supervivencia incluyen aquellos expresados por un virus con el fin de unirse, entrar en y replicarse en una célula. Son de particular interés secuencias víricas asociadas a enfermedades víricas crónicas. Secuencias víricas de particular interés incluyen secuencias de filovirus tales como virus del Ébola y virus de Marburgo (véase, por ejemplo, Geisbert et al., J. Infect. Dis., 193:1650-1657 (2006)); arenavirus tales como el virus de Lassa, virus de Junin, virus de Machupo, virus de Guanarito y virus de Sabia (Buchmeier et al., Arenaviridae: the viruses and their replication, en: FIELDS VIROLOGY, Knipe et al. (eds.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, (2001)); virus de la gripe tales como 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 (véanse, 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.), 4th ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (2001)); 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)).

Secuencias de ácidos nucleicos de filovirus a modo de ejemplo que pueden ser silenciadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, VP30, VP35, nucleoproteína (NP), proteína de polimerasa (L-pol)) y proteínas asociadas a membrana (por ejemplo, VP40, glucoproteína (GP), VP24). Secuencias del genoma completo para el virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso 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, N.º de acceso de Genbank U77385 y AY058897. Las secuencias de L-pol del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank X67110. Las secuencias de VP40 del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank AY058896. Las secuencias de NP del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank AY058895. Las secuencias de GP del virus del Ébola se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso 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 EE.UU. N.º 6.713.069. Secuencias del virus del Ébola adicionales se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de Genbank L11365 y X61274. Secuencias del genoma completo para el virus de Marburgo se exponen en, por ejemplo, N.º de

acceso de Genbank NC_001608; AY430365; AY430366; y AY358025. Las secuencias de GP del virus de Marburgo se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de Genbank AF005734; AF005733; y AF005732. Las secuencias de VP35 del virus de Marburgo se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de Genbank AF005731 y AF005730. Secuencias del virus de Marburgo adicionales se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de Genbank X64406; Z29337; AF005735; y Z12132. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirige a las secuencias de ácidos nucleicos del virus del Ébola y del virus de Marburgo incluyen aquellos descritos en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20070135370.

Secuencias de ácidos nucleicos del virus de la gripe a modo de ejemplo que pueden ser silenciadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos que codifican nucleoproteína (NP), proteínas de la matriz (M1 y M2), proteínas no estructurales (NS1 y NS2), ARN polimerasa (PA, PB1, PB2), neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA). Secuencias de NP de la gripe A se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso 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. Secuencias de PA de la gripe A se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso 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. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirige a las secuencias de ácidos nucleicos del virus de la gripe incluyen aquellos descritos en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20070218122.

Secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis a modo de ejemplo que pueden ser silenciadas incluyen, pero no se limitan a, secuencias de ácidos nucleicos implicadas en la transcripción y traducción (por ejemplo, En1, En2, X, P) y secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, proteínas de núcleo que incluyen proteínas C y relacionadas con C, proteínas de la cápside y de la envoltura que incluyen proteínas S, M y/o L, o fragmentos de las mismas) (véase, por ejemplo, FIELDS VIROLOGY, arriba). Secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis C (VHC) a modo de ejemplo que pueden ser silenciadas incluyen, pero no se limitan a, la región no traducida 5' (5'-UTR), la región no traducida 3' (3'-UTR), la región del codón de iniciación de la traducción de poliproteínas, la secuencia del sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), y/o secuencias de ácidos nucleicos que codifican la proteína de núcleo, la proteína E1, la proteína E2, la proteína p7, la proteína NS2, la proteasa NS3/helicasa, la proteína NS4A, la proteína NS4B, la proteína NS5A, y/o la ARN polimerasa dependiente de ARN de NS5B. Secuencias del genoma de VHC se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de Genbank NC_004102 (genotipo 1a de VHC), AJ238799 (genotipo 1b de VHC), NC_009823 (genotipo 2 de VHC), NC_009824 (genotipo 3 de VHC), NC_009825 (genotipo 4 de VHC), NC_009826 (genotipo 5 de VHC) y NC_009827 (genotipo 6 de VHC). Secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis A se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank NC_001489; secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis B se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank NC_003977; secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis D se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank NC_001653; secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis E se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank NC_001434; y secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis G se exponen en, por ejemplo, N.º de acceso de GenBank NC_001710. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados a infección vírica y supervivencia puede usarse convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar la afección vírica. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirige a las secuencias de ácidos nucleicos del virus de la hepatitis incluyen aquellos descritos en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20060281175, 20050058982 y 20070149470; la patente de EE.UU. N.º 7.348.314; y la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/162.127, presentada el 20 de marzo de 2009.

Genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, trastornos en los que el hígado es la diana y enfermedades y trastornos del hígado) incluyen, por ejemplo, genes expresados en dislipidemia (por ejemplo, receptores X del hígado tales como LXR α y LXR β (N.º de acceso de Genbank NM_007121), receptores X farnesoides (FXR) (N.º de acceso de GenBank NM_005123), proteína de unión al regulador del elemento de esterol (SREBP), proteasa del sitio 1 (SIP), 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima-A reductasa (HMG coenzima-A reductasa), apolipoproteína B (ApoB) (N.º de acceso de GenBank NM_000384), apolipoproteína CIII (ApoC3) (N.º de acceso de Genbank NM_000040 y NG_008949 REGIÓN: 5001..8164) y apolipoproteína E (ApoE) (N.º de acceso de Genbank NM_000041 y NG_007084 REGIÓN: 5001..8612)); y diabetes (por ejemplo, glucosa 6-fosfatasa) (véanse, 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 a enfermedades y trastornos metabólicos (por ejemplo, enfermedades y trastornos en los que el hígado es una diana y enfermedades y trastornos del hígado) incluyen genes que se expresan en el mismo hígado también y genes expresados en otros órganos y tejidos. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos puede usarse convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar la enfermedad o trastorno. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen ApoB incluyen aquellas descritas en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20060134189. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip

que se dirigen al gen ApoC3 incluyen aquellas descritas en la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/147.235, presentada el 26 de enero de 2009.

Ejemplos de secuencias de genes asociados a tumorigénesis y transformación de células (por ejemplo, cáncer u otra neoplasia) incluyen cinesinas mitóticas tales como Eg5 (KSP, KIF11; N.º de acceso de GenBank NM_004523); serina/treonina cinasas tales como cinasa 1 similar a polo (PLK-1) (N.º de acceso de GenBank NM_005030; Barr et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5:429-440 (2004)); tirosina cinasas tales como WEE1 (N.º de acceso de GenBank NM_003390 y NM_001143976); inhibidores de la apoptosis tales como XIAP (N.º de acceso de GenBank NM_001167); subunidades de signalosoma COP9 tales como CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 (JAB1; N.º de acceso de GenBank NM_006837); CSN6, CSN7A, CSN7B y CSN8; ubiquitina ligasas tales como COP1 (RFWD2; N.º de acceso de GenBank NM_022457 y NM_001001740); e histona desacetilasas tales como HDAC1, HDAC2 (N.º de acceso de GenBank NM_001527), HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, etc. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a los genes Eg5 y XIAP incluyen aquellas descritas en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/807.872, presentada el 29 de mayo de 2007. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen PLK-1 incluyen aquellas descritas en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20050107316 y 20070265438; y la solicitud de patente de EE.UU. N.º 12/343.342, presentada el 23 de diciembre de 2008. Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen CSN5 incluyen aquellas descritas en la solicitud provisional de EE.UU. N.º 61/045.251, presentada el 15 de abril de 2008p.

Ejemplos adicionales de secuencias de genes asociados a tumorigénesis y transformación de células incluyen secuencias de translocación tales como los genes de fusión 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 expresadas en exceso tales como genes de multirresistencia a fármaco (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 (Kosciulek et al., *Mol Cancer Ther.*, 2:209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, receptores del factor de crecimiento (por ejemplo, EGFR/ErbB1 (N.º de acceso de Genbank NM_005228, NM_201282, NM_201283 y NM_201284; véanse, por tanto, Nagy et al. *Exp. Cell Res.*, 285:39-49 (2003), ErbB2/HER-2 (N.º de acceso de Genbank NM_004448 y NM_001005862), ErbB3 (N.º de acceso de Genbank NM_001982 y NM_001005915) y ErbB4 (N.º de acceso de Genbank NM_005235 y NM_001042599); y secuencias mutadas tales como RAS (revisado en Tuschl y Borkhardt, *Mol. Interventions*, 2:158 (2002)). Ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen EGFR incluyen aquellas descritas en la solicitud de patente de EE.UU. N.º 11/807.872, presentada el 29 de mayo de 2007.

El silenciamiento de secuencias que codifican enzimas de reparación de ADN encuentran uso en combinación con la administración de agentes quimioterapéuticos (Collis et al., *Cancer Res.*, 63:1550 (2003)). Genes que codifican proteínas asociadas a la migración de tumor también son secuencias diana de interés, por ejemplo, integrinas, selectinas y metaloproteinasas. Los ejemplos anteriores no son exclusivos. Aquellos expertos en la materia entenderán que cualquier secuencia de gen completo o parcial que facilita o promueve la tumorigénesis o transformación de células, crecimiento tumoral, o migración de tumores puede incluirse como secuencia molde.

Los genes angiogénicos son capaces de promover la formación de nuevos vasos. Es de particular interés el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Reich et al., *Mol. Vis.*, 9:210 (2003)) o VEGFR. Secuencias de ARNip que se dirigen al VEGFR se exponen en, por ejemplo, el documento GB 2396864; publicación de patente de EE.UU. N.º 20040142895; y documento CA 2456444.

Los genes antiangiogénicos son capaces de inhibir la neovascularización. Estos genes son particularmente útiles para tratar aquellos cánceres en los que la angiogénesis desempeña una función en el desarrollo patológico de la enfermedad. Ejemplos de genes antiangiogénicos incluyen, pero no se limitan a, endostatina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 6.174.861), angiostatina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.639.725) y VEGFR2 (véase, por ejemplo, Decaussin et al., *J. Pathol.*, 188: 369-377 (1999)).

Genes inmunomoduladores son genes que modulan una o más respuestas inmunitarias. Ejemplos de genes inmunomoduladores incluyen, sin limitación, citocinas tales como factores de crecimiento (por ejemplo, TGF- α , TGF- β , 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 Fas y de ligando Fas también son secuencias diana inmunomoduladoras de interés (Song et al., *Nat. Med.*, 9:347 (2003)). Genes que codifican las moléculas de señalización secundarias en células hematopoyéticas y linfoides también están incluidas en la presente divulgación, por ejemplo, las cinasas de la familia Tec tales como la tirosina cinasa de Bruton (Btk) (Heinonen et al., *FEBS Lett.*, 527:274 (2002)).

Ligandos de receptores celulares incluyen ligandos que son capaces de unirse a receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor de insulina, receptor de EPO, receptores acoplados a proteína G, receptores con actividad de tirosina cinasas, receptores de citocina, receptores de factor de crecimiento, etc.), para modular (por ejemplo, inhibir, activar, etc.) la vía fisiológica en la que participa el receptor (por ejemplo, modulación del nivel de glucosa, desarrollo de células sanguíneas, mitogénesis, etc.). Ejemplos de ligandos de receptores celulares incluyen, pero no se limitan

a, citocinas, factores de crecimiento, interleucinas, interferones, eritropoyetina (EPO), insulina, glucagón, ligandos de receptor acoplado a proteína G, etc. Moldes que codifican una expansión de repeticiones de trinucleótidos (por ejemplo, repeticiones CAG) encuentran uso en silenciar las secuencias patógenas en trastornos neurodegenerativos producidos por la expansión de repeticiones de trinucleótidos, tales como atrofia muscular espinobulbar y enfermedad de Huntington (Caplen et al., Hum. Mol. Genet., 11:175 (2002)).

Además de su utilidad en silenciar la expresión de cualquiera de los genes anteriormente descritos para fines terapéuticos, los ARNip descritos en el presente documento también son útiles en aplicaciones de investigación y desarrollo, además de aplicaciones de diagnóstico, profilácticas, de pronóstico, clínicas y otras sanitarias. Como ejemplo no limitante, el ARNip puede usarse en estudios de validación de dianas dirigidos a probar si un gen de interés tiene el potencial de ser una diana terapéutica. El ARNip también puede usarse en estudios de identificación de dianas que pretenden descubrir genes como posibles dianas terapéuticas.

2. ARNia

Al igual que el ARNip, el ARN interferente asimétrico (ARNia) puede reclutar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y conducir a silenciamiento eficaz de una variedad de genes en células de mamífero mediando en la escisión específica de secuencia de la secuencia diana entre el nucleótido 10 y 11 con respecto al extremo 5' de la hebra no codificante (Sun et al., Nat. Biotech., 26:1379-1382 (2008)). Normalmente, una molécula de ARNia comprende un dúplex de ARN corto que tiene una hebra codificante y una hebra no codificante, en el que el dúplex contiene nucleótidos protuberantes en los extremos 3' y 5' de la hebra no codificante. El ARNia 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 moléculas de ARNia en condiciones similares a aquellas usadas para moléculas de ARNip. Como ejemplo no limitante, pueden seleccionarse y generarse secuencias de ARNia usando los métodos descritos anteriormente para seleccionar secuencias de ARNip.

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

En algunas realizaciones, el nucleótido protuberante no codificante en 5' contiene uno, dos, tres, cuatro, o más nucleótidos que no son elegidos como diana (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", etc.). En otras realizaciones, el nucleótido protuberante no codificante en 3' contiene uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos que no son elegidos como diana (por ejemplo, "AA", "UU", "dTdT", etc.). En ciertos aspectos, las moléculas de ARNia descritas en el presente documento pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, por ejemplo, en la región bicatenaria (dúplex) y/o en los nucleótidos protuberantes no codificantes. Como ejemplo no limitante, las secuencias de ARNia pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos anteriormente para las secuencias de ARNip. En una realización preferida, la molécula de ARNia 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 ciertas realizaciones, las moléculas de ARNia pueden comprender una hebra no codificante que se corresponde con la hebra no codificante de una molécula de ARNip, por ejemplo, una de las moléculas de ARNip descritas en el presente documento. En otras realizaciones, las moléculas de ARNia pueden usarse para silenciar la expresión de cualquiera de los genes diana expuestos anteriormente, tales como, por ejemplo, genes asociados a infección vírica y supervivencia, genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos, genes asociados a tumorigénesis y transformación de células, genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como aquellos asociados a respuestas inflamatorias y auto-inmunitarias, genes de receptor de ligando, y genes asociados a trastornos neurodegenerativos.

3. miARN

Generalmente, los microARN (miARN) son moléculas de ARN monocatenarias de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica. Los miARN están codificados por genes a partir de cuyo ADN se transcriben, pero los miARN no se traducen en proteína (ARN no codificante); en su lugar, cada transcrito primario (un pri-miARN) se procesa en una estructura de tallo-lazo corta denominado un pre-miARN y finalmente en un miARN maduro funcional. Moléculas de miARN maduras son o bien parcialmente o bien completamente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm), y su función principal es regular por disminución 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 miARN son mucho más largos que la molécula de miARN madura procesada. Los miARN se transcriben primero como transcritos primarios o pri-miARN con una terminación y cola de poli-A y se procesan a estructuras cortas de tallo-lazo de ~70 nucleótidos conocidas como pre-miARN en el núcleo celular. Este procesamiento se realiza en animales por un complejo de proteína 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 entonces en miARN maduro en el citoplasma por 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)). O bien la hebra codificante o bien la hebra no codificante de ADN pueden servir de moldes para dar lugar a miARN.

Cuando Dicer escinde el tallo-lazo de pre-miARN, se forman dos moléculas de ARN cortas complementarias, pero solo una se integra en el complejo de RISC. Esta hebra se conoce como la hebra guía y está seleccionada por la proteína argonauta, la RNasa catalíticamente activa del 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 de complejo de RISC (Gregory et al., Cell, 123:631-640 (2005)). Después de la integración en el complejo de RISC activo, los miARN se emparejan en bases con sus moléculas de ARNm complementarias e inducen la degradación de ARNm diana y/o el 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 ciertos casos, la hibridación del miARN con el ARNm diana inhibe la traducción de proteínas bloqueando la maquinaria de traducción de proteínas. En ciertos otros casos, la hibridación del miARN con el ARNm diana facilita la escisión y degradación del ARNm diana mediante un proceso similar a la interferencia por ARN (iARN). El miARN también puede dirigir la metilación de sitios genómicos que se corresponden con ARNm elegido como diana. Generalmente, los miARN funcionan en asociación con un complemento de proteínas conjuntamente denominado el miRNP.

En ciertos 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 normalmente 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 ciertos otros aspectos, 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 la secuencias de ARNip. 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.

En algunas realizaciones, las moléculas de miARN pueden usarse para silenciar la expresión de cualquiera de los genes diana expuestos anteriormente, tales como, por ejemplo, genes asociados a infección vírica y supervivencia, genes asociados a enfermedades y trastornos metabólicos, genes asociados a tumorigénesis y transformación de células, genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como aquellos asociados a respuestas inflamatorias y auto-inmunitarias, genes de receptor de ligando, y genes asociados a trastornos neurodegenerativos.

En otras realizaciones, uno o más agentes que bloquean la actividad de un miARN que se dirige a un ARNm de interés se administran usando una partícula de lípido descrita en el presente documento (por ejemplo, una partícula de ácido nucleico-lípido). Ejemplos de agentes de bloqueo incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de bloqueo estérico, oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueado y morfolino-oligonucleótidos. Tales agentes de bloqueo pueden unirse directamente al miARN o al sitio de unión de miARN en el ARNm diana.

4. Oligonucleótidos antisentido

En una realización, el ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido dirigido a un gen diana o secuencia de interés. Los términos "oligonucleótido antisentido" o "antisentido" incluyen oligonucleótidos que son complementarios a una secuencia de polinucleótidos elegida como diana. Los oligonucleótidos antisentido son hebras de ADN o ARN individuales que son complementarias a una secuencia elegida. Los oligonucleótidos de ARN antisentido previenen la traducción de hebras de ARN complementarias uniéndose al ARN. Los oligonucleótidos de ADN antisentido pueden usarse para dirigir un ARN complementario (codificante o no codificante) específico. Si se produce la unión, este híbrido de ADN/ARN puede ser degradado por la enzima RNasa H. En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido comprenden de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, más preferentemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El término también engloba oligonucleótidos antisentido que pueden no ser exactamente complementarios al gen diana deseado. Así, la invención puede utilizarse en casos donde actividades específicas no de diana se encuentran con antisentido, o donde una secuencia antisentido que contiene uno o más desapareamientos con la secuencia diana es la más preferida para un uso particular.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido son inhibidores eficaces y elegidos como diana de la síntesis de proteínas, y, por consiguiente, pueden usarse para inhibir específicamente la síntesis de proteínas por un gen elegido como diana. La eficacia de los oligonucleótidos antisentido para inhibir la síntesis de proteínas está bien

establecida. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y el receptor de acetilcolina de tipo 2 de muscarina se inhiben por oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus secuencias de ARNm respectivas (véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.739.119 y 5.759.829). Además, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la proteína nuclear ciclina, el gen de multirresistencia a fármaco (MDR1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABAA estriatal y EGF humano (véanse, 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 EE.UU. N.º 5.801.154; 5.789.573; 5.718.709 y 5.610.288). Además, también se han descrito construcciones antisentido que inhiben y pueden usarse para tratar una variedad de proliferaciones celulares anormales, por ejemplo, cáncer (véanse las patentes de EE.UU. N.º 5.747.470; 5.591.317; y 5.783.683).

Se conocen en la técnica métodos de producción de oligonucleótidos antisentido y pueden ser fácilmente adaptados para producir un oligonucleótido antisentido que dirige cualquier secuencia de polinucleótidos. La selección de secuencias de oligonucleótidos antisentido específicas para una secuencia diana dada se basa en el análisis de la secuencia diana elegida y la determinación de la estructura secundaria, T_m , energía de unión y estabilidad relativa. Pueden seleccionarse oligonucleótidos antisentido basándose en su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas, u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana en una célula hospedadora. Regiones diana altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de iniciación de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a regiones 5' del ARNm. Estos análisis de estructuras secundarias y consideraciones de selección de sitios diana pueden realizarse, por ejemplo, usando v.4 del software de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el software del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-402 (1997)).

5. Ribozimas

Según otra realización de la presente divulgación, las partículas de ácido nucleico-lípido están asociadas con ribozimas. Las ribozimas son complejos de ARN-proteína que tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad de endonucleasa (véanse, 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, escindiendo frecuentemente solo uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (véanse, 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 ha sido atribuida al requisito que el sustrato se une mediante interacciones de apareamiento de bases específicas a la secuencia de guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

Actualmente se conocen al menos seis variedades básicas de moléculas de ARN enzimáticas que existen de forma natural. Cada una puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster de ARN en trans (y así puede escindir otras moléculas de ARN) bajo condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN. Tal unión se produce mediante la porción de unión diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa escindiendo el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce primero y luego se une al ARN diana mediante emparejamiento de bases complementario, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de un ARN diana tal destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que se haya unido un ácido nucleico enzimático y haya escindido su diana de ARN, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede unirse repetidamente y escindir nuevas dianas.

La molécula de ácido nucleico enzimática puede formarse en un ARN de cabeza de martillo, de horquilla, de virus de la hepatitis δ , de intrón de grupo I o de RNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN), o motivo de ARN de Neurospora VS, por ejemplo. Ejemplos específicos de motivos de cabeza de martillo se describen en, por ejemplo, Rossi et al., Nucleic Acids Res., 20:4559-65 (1992). 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 EE.UU. N.º 5.631.359. Un ejemplo del 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). Ejemplos del motivo de ribozima de ARN de Neurospora VS se describe 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 EE.UU. N.º 4.987.071. Características importantes de moléculas de ácidos nucleicos enzimáticas usadas según la presente divulgación son aquellas que tienen un sitio de unión a sustrato específico que es complementario a una o más de las regiones de ADN o ARN de gen diana, y aquellas que tienen secuencias de nucleótidos dentro de o que rodean ese sitio de unión a sustrato que confiere una actividad de escisión de ARN para la molécula. Así, las construcciones de ribozima no necesitan limitarse a motivos específicos mencionados en el presente documento.

Se conocen en la técnica métodos de producción de una ribozima dirigida a cualquier secuencia de polinucleótidos. Pueden diseñarse ribozimas como se describe en, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 93/23569 y WO 94/02595, y sintetizarse para ser probadas *in vitro* y/o *in vivo* como se describe en el presente documento.

La actividad de ribozima puede optimizarse alterando la longitud de los brazos de unión de ribozima o sintetizando químicamente ribozimas con modificaciones que previenen su degradación por ribonucleasas del suero (véanse, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 92/07065, WO 93/15187, WO 91/03162 y WO 94/13688; EP 92110298.4; y las patentes de EE.UU. N.º 5.334.711, que describen diversas modificaciones químicas que pueden hacerse a los restos de azúcar de moléculas de ARN enzimáticas), modificaciones que potencian su eficacia en células, y eliminación de bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis de ARN y reducir los requisitos químicos.

6. Oligonucleótidos inmunoestimulantes

Los ácidos nucleicos asociados a partículas de lípido de la presente divulgación pueden ser inmunoestimulantes, que incluyen oligonucleótidos inmunoestimulantes (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, ciertos palíndromos que conducen a estructuras secundarias de horquilla (véase Yamamoto et al., J. Immunol., 148:4072-6 (1992)), o motivos CpG, además de otras características de ISS conocidas (tales como dominios multi-G; véase; la publicación PCT N.º WO 96/11266).

Se considera que los ácidos nucleicos inmunoestimulantes no son específicos de secuencia cuando no se requiere que se unan específicamente a y reduzcan la expresión de una secuencia diana con el fin de provocar una respuesta inmunitaria. Así, ciertos ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen que existe de forma natural o ARNm, pero pueden todavía considerarse ácidos nucleicos inmunoestimulantes no específicos de secuencia.

En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido inmunoestimulante comprende al menos un dinucleótido de CpG. El oligonucleótido o dinucleótido de CpG puede estar sin metilar o metilado. En otra realización, el ácido nucleico inmunoestimulante comprende al menos un dinucleótido de CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un único 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 los dinucleótidos de CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina en los dinucleótidos de CpG presente en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende una pluralidad de dinucleótidos de CpG, en el que al menos uno de los dinucleótidos de CpG comprende una citosina metilada. Ejemplos de oligonucleótidos inmunoestimulantes adecuados para su uso en las composiciones y métodos de la presente divulgación se describen en la solicitud PCT N.º PCT/US08/88676, presentada el 31 de diciembre de 2008, publicaciones PCT N.º WO 02/069369 y WO 01/15726, la patente de EE.UU. N.º 6.406.705, y Raney et al., J. Pharm. Exper. Ther., 298:1185-92 (2001). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos usados en las composiciones y métodos de la divulgación tienen un esqueleto de fosfodiéster ("PO") o un esqueleto de fosforotioato ("PS"), y/o al menos un resto de citosina metilado en un motivo de CpG.

B. Otros agentes activos

En ciertas realizaciones, el agente activo asociado a las partículas de lípido de la presente divulgación puede comprender una o más proteínas terapéuticas, polipéptidos, o moléculas orgánicas pequeñas o compuestos. Ejemplos no limitantes de tales agentes terapéuticamente eficaces o fármacos incluyen fármacos de oncología (por ejemplo, fármacos de quimioterapia, agentes terapéuticos hormonales, agentes inmunoterapéuticos, agentes radioterapéuticos, etc.), agentes hipolipemiantes, fármacos antivíricos, compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación anticonceptiva, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la transducción de señales, fármacos cardiovasculares tales como agentes antiarrítmicos, hormonas, vasoconstrictores y esteroides. Estos agentes activos pueden administrarse solos en las partículas de lípido de la presente divulgación, o en combinación (por ejemplo, co-administrarse) con partículas de lípido de la presente divulgación que comprenden ácido nucleico tal como ARN interferente.

Ejemplos no limitantes de fármacos de quimioterapia incluyen fármacos basados en platino (por ejemplo, oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iroplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfan, melfalan, mecloretamina, uramustina, tiotepa, nitrosoureas, etc.), antimetabolitos (por ejemplo, 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, etc.), alcaloides de planta (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (taxol), docetaxel, etc.), inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, irinotecan (CPT-11; Camptosar), topotecan, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (por ejemplo, doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), inhibidores de tirosina cinasas (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.

Ejemplos de agentes terapéuticos hormonales convencionales incluyen, sin limitación, esteroides (por ejemplo,

dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasa, tamoxifeno y goserelina, además de otros agonistas de hormonas liberadoras de gonadotropina (GnRH).

Ejemplos de agentes inmunoterapéuticos convencionales incluyen, pero no se limitan a, inmunoestimulantes (por ejemplo, Bacillus Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleucina-2, alfa-interferón, 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-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de *Pseudomonas*, etc.) y radioinmunoterapia (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con ^{111}In , ^{90}Y o ^{131}I , etc.).

Ejemplos de agentes radioterapéuticos convencionales incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos tales como ^{47}Sc , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{89}Sr , ^{86}Y , ^{87}Y , ^{90}Y , ^{105}Rh , ^{111}Ag , ^{111}In , $^{117\text{m}}\text{Sn}$, ^{149}Pm , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{177}Lu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{211}At y ^{212}Bi , opcionalmente conjugados con anticuerpos dirigidos contra antígenos de tumor.

Fármacos de oncología adicionales que pueden usarse según la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, alkeran, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, bexaroteno, biCNU, carmustina, CCNU, celecoxib, cladribina, ciclosporina A, citosina arabinósido, citoxano, dexrazoxano, DTIC, estramustina, exemestano, FK506, gemtuzumab-ozogamicina, Hydrea, hidroxiaurea, idarubicina, interferón, letrozol, leustatina, leuprolida, litretinoína, megastrol, L-PAM, mesna, metoxsalen, mitramicina, mostaza de nitrógeno, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfimer sodio, prednisona, rituxan, estreptozocina, STI-571, taxotere, temozolamida, VM-26, toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina y velban. Otros ejemplos de fármacos de oncología que pueden usarse según la presente divulgación son elipticina y análogos o derivados de elipticina, epotilonas, inhibidores de cinasas intracelulares y camptotecinas.

Ejemplos no limitantes de agentes hipolipemiantes para tratar una enfermedad o trastorno de lípidos asociado a triglicéridos elevados, colesterol y/o glucosa incluyen estatinas, fibratos, ezetimiba, tiazolidindionas, niacina, beta-bloqueantes, nitroglicerina, antagonistas del calcio, aceite de pescado, y mezclas de los mismos.

Ejemplos de fármacos antivíricos incluyen, pero no se limitan a, abacavir, aciclovir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, arbidol, atazanavir, atipla, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, inhibidores de la entrada, famciclovir, combinaciones de dosis fija, fomivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, inhibidores de la fusión, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidores de integrasa, interferón tipo III (por ejemplo, moléculas de IFN- λ tales como IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3), interferón tipo II (por ejemplo, IFN- γ), interferón tipo I (por ejemplo, IFN- α tal como IFN- α PEGilado, IFN- β , IFN- κ , IFN- δ , IFN- ϵ , IFN- τ , IFN- ω y IFN- ζ), interferón, lamivudina, lopinavir, loviroda, MK-0518, maraviroc, moroxidina, nelfinavir, nevirapina, nexavir, análogos de nucleósido, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la transcriptasa inversa, ribavirina, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, potenciadores sinérgicos, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, truvada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir, zidovudina, sales farmacéuticamente aceptables de los mismos, estereoisómeros de los mismos, derivados de los mismos, análogos de los mismos, y mezclas de los mismos.

V. Partículas de lípido

Las partículas de lípido de la presente divulgación normalmente comprenden un agente activo o agente terapéutico, un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y un conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas. En algunas realizaciones, el agente activo o agente terapéutico está completamente encapsulado dentro de la porción de lípido de la partícula de lípido de forma que el agente activo o agente terapéutico en la partícula de lípido sea resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, por ejemplo, por una nucleasa o proteasa. En otras realizaciones, las partículas de lípido descritas en el presente documento son sustancialmente no tóxicas para los mamíferos tales como los seres humanos. Las partículas de lípido de la presente divulgación normalmente tienen un diámetro medio 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.

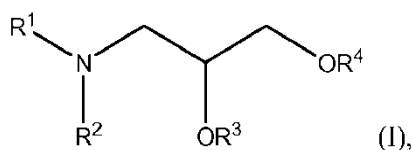
En realizaciones preferidas, las partículas de lípido de la presente divulgación son partículas de ácido nucleico-lípido (SNALP) estables en suero que comprenden un ARN interferente (por ejemplo, ARNip, ARNiA y/o miARN), un lípido catiónico (por ejemplo, un lípido catiónico de fórmulas I, II y/o III), un lípido no catiónico (por ejemplo, colesterol solo o mezclas de uno o más fosfolípidos y colesterol), y un conjugado de lípido que inhibe la agregación de las partículas (por ejemplo, uno o más conjugados de PEG-lípido). Las SNALP pueden comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más moléculas de ARN interferente no modificado y/o modificado. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 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 publicación PCT N.º WO 96/40964.

A. Lípidos catiónicos

Puede usarse cualquiera de una variedad de lípidos catiónicos en las partículas de lípido de la presente divulgación (por ejemplo, SNALP), tanto solos como en combinación con uno o varios de otras especies de lípidos catiónicos o especies de lípidos no catiónicos.

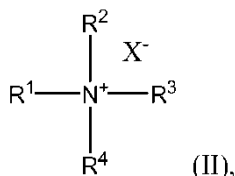
Lípidos catiónicos que son útiles en la presente invención pueden ser cualquiera de varias especies de lípido que llevan una carga positiva neta a pH fisiológico. Tales lípidos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil)colesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE), 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminotrifluoroacetato (DOSPA), dioctadecilamidodiglicilespermina (PERROS), 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'-dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), 1,2-dilinoilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLinCDAP), y mezclas de los mismos. Varios estos lípidos y análogos relacionados se han descrito en las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20060083780 y 20060240554; las patentes de EE.UU. 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. Adicionalmente, están disponibles varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos y pueden usarse en la presente invención. Éstas incluyen, por ejemplo, LIPOFECTIN® (liposomas catiónicos comercialmente disponibles que comprenden DOTMA y DOPE, de GIBCO/BRL, Grand Island, Nueva York, EE.UU.); LIPOFECTAMINE® (liposomas catiónicos comercialmente disponibles que comprenden DOSPA y DOPE, de GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM® (liposomas catiónicos comercialmente disponibles que comprenden DOGS de Promega Corp., Madison, Wisconsin, EE.UU.).

Adicionalmente, lípidos catiónicos de fórmula I que tienen las siguientes estructuras son útiles en la presente invención.



en la que R¹ y R² están seleccionados independientemente y son H o alquilos C₁-C₃, R³ y R⁴ están seleccionados 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 ciertos casos, R³ y R⁴ son los dos los mismos, es decir, R³ y R⁴ son ambos linoleílo (C₁₈), etc. En ciertos otros casos, R³ y R⁴ son diferentes, es decir, R³ es tetradecatrienilo (C₁₄) y R⁴ es linoleílo (C₁₈). En una realización preferida, el lípido catiónico de fórmula I es simétrico, es decir, R³ y R⁴ son los dos iguales. En otra realización preferida, tanto R³ como R⁴ comprenden al menos dos sitios de insaturación. En algunas realizaciones, R³ y R⁴ están seleccionados independientemente del grupo que consiste en dodecadienilo, tetradecadienilo, hexadecadienilo, linoleílo e icosadienilo. En una realización preferida, R³ y R⁴ son ambos linoleílo. En algunas realizaciones, R³ y R⁴ comprenden al menos tres sitios de insaturación y están seleccionados independientemente de, por ejemplo, dodecatrienilo, tetradecatrienilo, hexadecatrienilo, linolenilo e icosatrienilo. En realizaciones particularmente preferidas, el lípido catiónico de fórmula I es 1,2-dilinoiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA) o 1,2-dilinoilenilo-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA).

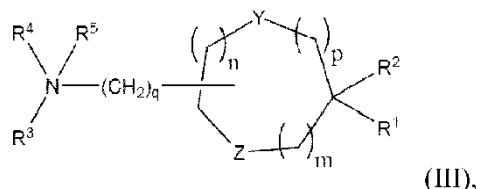
Además, lípidos catiónicos de fórmula II que tienen las siguientes estructuras son útiles en la presente invención.



en la que R¹ y R² están seleccionados independientemente y son H o alquilos C₁-C₃, R³ y R⁴ están seleccionados 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 ciertos casos, R³ y R⁴ son ambos iguales, es decir, R³ y R⁴ son ambos linoleílo (C₁₈), etc. En ciertos otros casos, R³ y R⁴ son diferentes, es decir, R³ es tetradecatrienilo (C₁₄) y R⁴ es linoleílo (C₁₈). En una realización preferida, los lípidos catiónicos de la presente invención son simétricos, es decir, R³ y R⁴ son los dos iguales. En otra realización preferida, tanto R³ como R⁴ comprenden al menos dos sitios de insaturación. En algunas realizaciones, R³ y R⁴ están seleccionados

independientemente del grupo que consiste en dodecadienilo, tetradecadienilo, hexadecadienilo, linoleílo e icosadienilo. En una realización preferida, R^3 y R^4 son ambos linoleílo. En algunas realizaciones, R^3 y R^4 comprenden al menos tres sitios de insaturación y están seleccionados independientemente de, por ejemplo, dodecatrienilo, tetradecatrienilo, hexadecatrienilo, linolenilo e icosatrienilo.

Además, los lípidos catiónicos de fórmula III que tienen las siguientes estructuras (o sales de los mismos) son útiles en la presente invención.



en la que R^1 y R^2 son tanto iguales como diferentes e independientemente alquilo C_{12} - C_{24} opcionalmente sustituido, alquenilo C_{12} - C_{24} opcionalmente sustituido, alquinilo C_{12} - C_{24} opcionalmente sustituido, o acilo C_{12} - C_{24} opcionalmente sustituido; R^3 y R^4 son tanto iguales como diferentes e independientemente alquilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido, alquenilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido o alquinilo C_1 - C_6 opcionalmente sustituido, o R^3 y R^4 pueden unirse para formar un anillo heterocíclico opcionalmente sustituido de 4 a 6 átomos de carbono y 1 o 2 heteroátomos elegidos de nitrógeno y oxígeno; R^5 está o bien ausente o bien es hidrógeno o alquilo C_1 - C_6 para proporcionar una amina cuaternaria; m, n y p son tanto los mismos como diferentes e independientemente cualquiera de 0 o 1 con la condición de que m, n y p no sean simultáneamente 0; q es 0, 1, 2, 3 o 4; y Y y Z son tanto los mismos como diferentes e independientemente O, S o NH.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico de fórmula III es 2,2-dilinoil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; "XTC2"), 2,2-dilinoil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA), 2,2-dilinoil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA), 2,2-dilinoil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoil-4-N-metilpiperazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dilinoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 1,2-dilinoilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoiloxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoiloxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoil-2-linoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMA), sal de cloruro de 1,2-dilinoiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), de cloruro de 1,2-dilinoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodiol (DOAP), 1,2-dilinoiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), o mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el lípido catiónico de fórmula III es DLin-K-C2-DMA (XTC2).

El lípido catiónico normalmente comprende de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 90 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 85 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 80 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 75 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 70 % en moles, de aproximadamente el 50 % en moles a aproximadamente el 65 % en moles, o de aproximadamente el 55 % en moles a aproximadamente el 65 % en moles del lípido total presente en la partícula.

Será rápidamente evidente para un experto en la materia que dependiendo del uso previsto de las partículas, las proporciones de los componentes pueden variarse y la eficiencia de administración de una formulación particular puede medirse usando, por ejemplo, un ensayo de parámetros de liberación endosómica (ERP).

B. Lípidos no catiónicos

Los lípidos no catiónicos usados en las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden ser cualquiera de una variedad de lípidos sin carga, de ión bipolar o aniónicos neutros capaces de producir un complejo estable.

Ejemplos no limitantes de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM), cefalina, cardiolipina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC), palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE), lisofosfatidilcolina, dilinoilfosfatidilcolina, 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 tienen cadenas de carbono C₁₀-C₂₄, por ejemplo, lauroílo, miristoílo, palmitoílo, estearoílo u oleoílo.

- 5 Ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroides tales como colesterol y derivados del mismo tales como colestanol, colestanona, colestenona, coprostanol, colesteryl-2'-hidroxietil éter, colesteryl-4'-hidroxibutil éter, y mezclas de los mismos.

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

15 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, laurilsulfato de trietanolamina, amidas de ácidos grasos polietiloxiladas con sulfato de alquil-arilo, bromuro de dioctadecildimetilamonio, ceramida, esfingomielina, y similares.

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

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

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

45 En realizaciones adicionales, el colesterol presente en las partículas de lípido que contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol comprende de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, o de aproximadamente el 17 % en moles a aproximadamente el 23 % en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol a aproximadamente el 20 % en moles del lípido total presente en la partícula.

50 En las realizaciones descritas en el presente documento donde las partículas de lípido contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol o un derivado de colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente el 40, 45, 50, 55 o el 60 % en moles del lípido total presente en la partícula. En ciertos casos, el componente de fosfolípido en la mezcla puede comprender de aproximadamente el 2 % en moles a aproximadamente el 12 % en moles, de aproximadamente el 4 % en moles a aproximadamente el 10 % en moles, de aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 10 % en moles, de aproximadamente el 5 % en moles a aproximadamente el 9 % en moles, o de aproximadamente el 6 % en moles a aproximadamente el 8 % en moles del lípido total presente en la partícula. Como ejemplo no limitante, una partícula de lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC a aproximadamente el 7 % en moles (por ejemplo, en una mezcla con aproximadamente 34 % en moles de colesterol) del lípido total presente en la partícula. En ciertos otros casos, el componente de fosfolípido en la mezcla puede comprender de aproximadamente el 10 % en moles a aproximadamente el 30 % en moles, de aproximadamente el 15 % en moles a aproximadamente el 25 % en moles, o de aproximadamente el 17 % en moles a aproximadamente el 23 % en moles del lípido total presente en la partícula. Como otro ejemplo no limitante, una partícula de lípido que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC a aproximadamente el 20 % en moles (por ejemplo, en una mezcla con aproximadamente 20 % en moles de colesterol) del lípido total presente en la partícula.

C. Conjugado de lípido

Además de lípidos catiónicos y no catiónicos, las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) comprenden un conjugado de lípido. El conjugado de lípido es útil porque previene la agregación de partículas. Lípidos conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a, conjugados de PEG-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados de polímero catiónico-lípido (CPL), y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones, las partículas comprenden o bien un conjugado de PEG-lípido o bien un conjugado de ATTA-lípido junto con un CPL.

En una realización preferida, el conjugado de lípido es un PEG-lípido. Ejemplos de PEG-lípidos incluyen, pero no se limitan a, PEG acoplado a dialquiloxypropilos (PEG-DAA) como se describe en, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) como se describe en, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20030077829 y 2005008689, PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado con ceramidas como se describe en, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.885.613, PEG conjugado con colesterol o un derivado del mismo, y mezclas de los mismos. PEG-lípidos adicionales incluyen, sin limitación, PEG-C-DOMG, 2KPEG-DMG, y una mezcla de los mismos.

PEG es un polímero soluble en agua lineal de unidades de repetición de etileno-PEG con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 5.000 daltons. Los PEG están comercialmente disponibles de Sigma Chemical Co. y otras compañías e incluyen, por ejemplo, los siguientes: monometoxipoli(etilenglicol) (MePEG-OH), monometoxipoli(etilenglicol)-succinato (MePEG-S), monometoxipoli(etilenglicol)-succinimidil succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipoli(etilenglicol)-amina (MePEG-NH₂), monometoxipoli(etilenglicol)-tresilato (MePEG-TRES) y monometoxipoli(etilenglicol)-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM). Otros PEG tales como aquellos descritos en las patentes de EE.UU. 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 monometoxipoli(etilenglicol)-ácido acético (MePEG-CH₂COOH) es particularmente útil para preparar conjugados de PEG-lípido que incluyen, por ejemplo, conjugados de PEG-DAA.

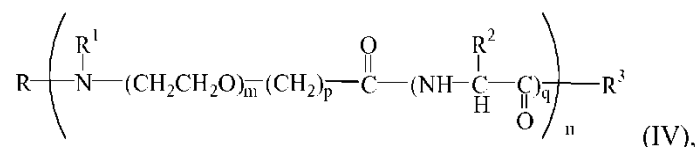
El resto de PEG de los conjugados de PEG-lípido descritos en el presente documento puede comprender un peso molecular promedio que oscila de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En ciertos casos, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente el 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, etc.). En realizaciones preferidas, el resto de PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons o aproximadamente 750 daltons.

En ciertos casos, el PEG puede estar opcionalmente sustituido con un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG puede conjugarse directamente con el lípido o puede unirse al lípido mediante un resto conector. Puede usarse cualquier resto conector adecuado para acoplar el PEG a un lípido que incluye, por ejemplo, restos conectores que no contienen éster y restos conectores que contienen éster. En una realización preferida, el resto conector es un resto conector que no contiene éster. Como se usa en el presente documento, el término "resto conector que no contiene éster" se refiere a un resto conector que no contiene un enlace éster carboxílico (-OC(O)-). Restos conectores que no contienen éster adecuados incluyen, pero no se limitan a, amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonilo (-C(O)-), carbamato (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), disulfuro (-S-S-), éter (-O-), succinilo (-O)CCH₂CH₂C(O)-, succinamidilo (-NHC(O)CH₂CH₂C(O)NH-), éter, disulfuro, además de combinaciones de los mismos (tales como un conector que contiene tanto un resto conector carbamato como un resto conector amido). En una realización preferida, se usa un conector de carbamato para acoplar el PEG al lípido.

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

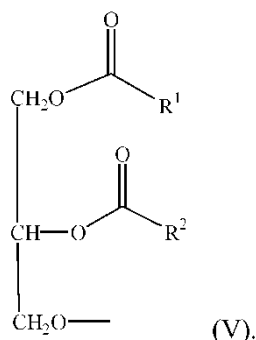
Pueden conjugarse fosfatidiletanolaminas que tienen una variedad de grupos de cadena de acilo de longitudes de cadena y grados de saturación variables con PEG para formar el conjugado de lípido. Tales fosfatidiletanolaminas están comercialmente disponibles, o pueden aislarse o sintetizarse usando técnicas convencionales conocidas para aquellos expertos en la materia. Se prefieren las 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 mono- o digrasos insaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE).

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

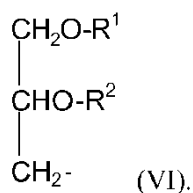


en la que R es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R¹ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; u opcionalmente, R y R¹ y el nitrógeno al que están unidos, forman un resto azido; R² es un miembro del grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y una cadena lateral de un aminoácido; R³ es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR⁴R⁵, en la 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 aquellos expertos en la materia que pueden usarse otras poliamidas en los compuestos de la presente divulgación.

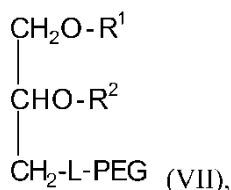
El término "diacilglicerol" se refiere a un compuesto que tiene 2 cadenas de acilo grasas, R¹ y R², ambos de los cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos unidos a la posición 1 y 2 de glicerol por enlaces éster. Los grupos acilo pueden estar saturados o tener grados de insaturación variables. Grupos acilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, 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. Los diacilgliceroles tienen la siguiente fórmula general:



El término "dialquioxipropilo" se refiere a un compuesto que tiene 2 cadenas de alquilo, R¹ y R², ambos de los cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos. Los grupos alquilo pueden estar saturados o tener grados de insaturación variables. Los dialquioxipropilos tienen la siguiente fórmula general:



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



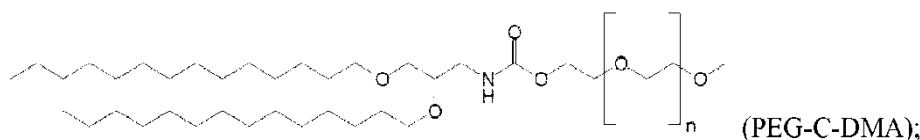
en la que R¹ y R² están seleccionados independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono; PEG es un polietilenglicol; y L es un resto conector que no contiene éster o un resto conector que contiene éster como se ha descrito anteriormente. Los grupos alquilo de cadena larga pueden estar saturados o insaturados. Grupos alquilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, 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 esterarilo (es decir, diestearilo), etc.

En la fórmula VII anterior, el PEG tiene un peso molecular promedio que oscila de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En ciertos casos, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente

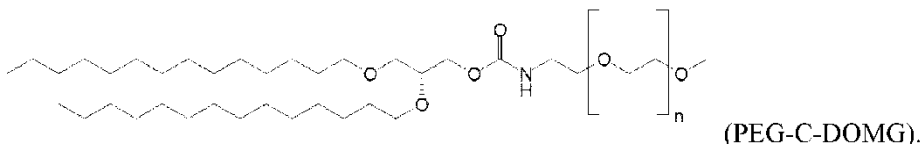
750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (por ejemplo, de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, etc.). En realizaciones preferidas, el PEG tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons o aproximadamente 750 daltons. El PEG puede estar opcionalmente sustituido con alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En ciertas realizaciones, el grupo hidroxilo terminal está sustituido con un grupo metoxi o metilo.

En una realización preferida, "L" es un resto conector que no contiene éster. Conectores que no contienen éster adecuados incluyen, pero no se limitan a, un resto conector de amido, un resto conector de amino, un resto conector de carbonilo, un resto conector de carbamato, un resto conector de urea, un resto conector de éter, un resto conector de disulfuro, un resto conector de succinamido, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el resto conector que no contiene éster es un resto conector de carbamato (es decir, un conjugado de PEG-C-DAA). En otra realización preferida, el resto conector que no contiene éster es un resto conector de amido (es decir, un conjugado de PEG-A-DAA). En otra realización preferida más, el resto conector que no contiene éster es un resto conector de succinamido (es decir, un conjugado de PEG-S-DAA).

En realizaciones particulares, el conjugado de PEG-lípido está seleccionado de:



y



Los conjugados de PEG-DAA se sintetizan usando técnicas convencionales y reactivos conocidos para aquellos expertos en la materia. Se reconocerá que los conjugados de PEG-DAA contendrán diversos enlaces amida, amina, éter, tio, carbamato y urea. Aquellos expertos en la materia reconocerán que los métodos y reactivos para formar estos enlaces son muy 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, 5th ed. (Longman 1989). También se apreciará que cualquier grupo funcional presente puede requerir protección y desprotección en diferentes puntos en la síntesis de los conjugados de PEG-DAA. Aquellos expertos en la materia reconocerán que tales técnicas son muy conocidas. Véase, por ejemplo, Green y Wuts, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS (Wiley 1991).

Preferentemente, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de dilauryloxipropilo (C_{12})-PEG, conjugado de dimiristiloxipropilo (C_{14})-PEG, un conjugado de dipalmitiloxipropilo (C_{16})-PEG, o un conjugado de diesteariloxipropilo (C_{18})-PEG. Aquellos expertos en la materia apreciarán fácilmente que otros dialquioxipropilos pueden usarse en los conjugados de PEG-DAA de la presente divulgación.

Además de lo anterior, será rápidamente evidente para aquellos expertos en la materia que pueden usarse otros polímeros hidrófilos en lugar de PEG. Ejemplos de polímeros adecuados que pueden usarse en lugar de PEG incluyen, pero no se limitan a, polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropil metacrilamida, polimetacrilamida y polidimetilacrilamida, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, y celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

Además de los componentes anteriores, las partículas (por ejemplo, SNALP o SPLP) de la presente divulgación pueden comprender además lípidos de poli(etilenglicol) (PEG) catiónico o CPL (véase, por ejemplo, Chen et al., Bioconj. Chem., 11:433-437 (2000)). SPLP y SPLP-CPL adecuados para su uso en la presente divulgación, y métodos de preparación y uso de SPLP y SPLP-CPL, se desvelan, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 6.852.334 y publicación PCT N.º WO 00/62813.

CPL adecuados incluyen compuestos de fórmula VIII:



en la que A, W y Y son como se describen a continuación.

Con referencia a la fórmula VIII, "A" es un resto de lípido tal como un lípido anfipático, un lípido neutro, o un lípido

hidrófobo que actúa de un anclaje de lípido. Ejemplos de lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, diacilglicerolilos, dialquilglicerolilos, N,N-dialquilaminos, 1,2-diaciloxi-3-aminopropanos y 1,2-dialquil-3-aminopropanos.

- 5 "W" es un polímero o un oligómero tal como un polímero hidrófilo u oligómero. Preferentemente, el polímero hidrófilo es un polímero biocompatible que es no inmunogénico o posee baja inmunogenicidad inherente. Alternativamente, el polímero hidrófilo puede ser débilmente antigénico si se usa con adyuvantes apropiados. Polímeros no inmunogénicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, PEG, poliamidas, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, copolímeros de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, y combinaciones de los mismos. En una realización preferida, el
10 polímero tiene un peso molecular de aproximadamente 250 a aproximadamente 7.000 daltons.

- "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 pH fisiológico. Restos policatiónicos adecuados incluyen aminoácidos básicos y sus derivados tales como arginina, asparagina, glutamina, lisina e histidina; espermina; espermidina; dendrímeros catiónicos; poliaminas; azúcares de poliamina; y aminopolisacáridos. Los restos policatiónicos pueden ser lineales, tales como tetralisina lineal, ramificada o dendrímica en estructura. Los restos policatiónicos tienen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 15 cargas positivas, preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 12 cargas
15 positivas, y más preferentemente entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 cargas positivas a valores de pH seleccionados. La selección del resto policatiónico a emplear puede determinarse por el tipo de aplicación de partícula que se desea.

- Las cargas en los restos policatiónicos pueden estar o bien distribuidas alrededor del resto de partícula entera, o alternativamente, pueden ser una concentración discreta de densidad de carga en un área particular del resto de
25 partícula, por ejemplo, un pico de carga. Si la densidad de carga está distribuida en la partícula, la densidad de carga puede estar igualmente distribuida o desigualmente distribuida. Todas las variaciones de distribución de carga del resto policatiónico están englobadas por la presente divulgación.

- El lípido "A" y el polímero no inmunogénico "W" pueden unirse por diversos métodos y preferentemente por unión covalente. Métodos conocidos para aquellos expertos en la materia pueden usarse para la unión covalente de "A" y "W". Enlaces adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlaces amida, amina, carboxilo, carbonato, carbamato, éster e hidrazona. Será evidente para aquellos expertos en la materia que "A" y "W" deben tener grupos funcionales complementarios para efectuar el enlace. La reacción de estos dos grupos, uno en el lípido y el otro en el polímero, proporcionará el enlace deseado. Por ejemplo, cuando el lípido es un diacilglicerol y el hidroxilo terminal se activa, por ejemplo con NHS y DCC, para formar un éster activo, y entonces se hace reaccionar con un polímero que
35 contiene un grupo amino, tal como con una poliamida (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 6.320.017 y 6.586.559), se formará un enlace amida entre los dos grupos.

- En ciertos casos, el resto policatiónico puede tener un ligando unido, tal como un ligando de direccionamiento o un
40 resto quelante para complejar el calcio. Preferentemente, después de que el ligando se una, el resto catiónico mantiene una carga positiva. En ciertos casos, el ligando que está unido tiene una carga positiva. Ligandos adecuados incluyen, pero no se limitan a, un compuesto o dispositivo con un grupo funcional reactivo e incluyen lípidos, lípidos anfipáticos, compuestos de vehículo, compuestos de bioafinidad, biomateriales, biopolímeros, dispositivos biomédicos, compuestos analíticamente detectables, compuestos terapéuticamente activos, enzimas, péptidos, proteínas, anticuerpos, inmunoestimulantes, radiomarcas, fluorógenos, biotina, fármacos, haptenos, ADN, ARN, polisacáridos, liposomas, virosomas, micelas, inmunoglobulinas, grupos funcionales, otros restos de direccionamiento, o toxinas.

- El conjugado de lípido (por ejemplo, PEG-lípido) normalmente comprende de aproximadamente el 0,1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles, de aproximadamente el 0,5 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles, de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 2 % en moles, de aproximadamente el 0,6 % en moles a aproximadamente el 1,9 % en moles, de aproximadamente el 0,7 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 0,8 % en moles a aproximadamente el 1,7 % en moles, de aproximadamente el 0,9 % en moles a aproximadamente el 1,6 % en moles, de aproximadamente el 0,9 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 1 % en moles a aproximadamente el 1,7 % en moles, de aproximadamente el 1,2 % en moles a aproximadamente el 1,8 % en moles, de aproximadamente el 1,2 % en moles a aproximadamente el 1,7 % en moles, de aproximadamente el 1,3 % en moles a aproximadamente el 1,6 % en moles, o de aproximadamente el 1,4 % en moles a aproximadamente el 1,5 % en moles del lípido total presente en la partícula.

- Un experto habitual en la materia apreciará que la concentración del conjugado de lípido puede variarse dependiendo del conjugado de lípido empleado y la tasa a la que la partícula de ácido nucleico-lípido va a ser fusogénica.

- 65 Controlando la composición y concentración del conjugado de lípido, puede controlarse la tasa a la que el conjugado de lípido intercambia la partícula de ácido nucleico-lípido y, a su vez, la tasa a la que la partícula de ácido nucleico-

lípidos llega a ser fusogénica. Por ejemplo, cuando un conjugado de PEG-fosfatidiletanolamina o un conjugado de PEG-ceramida se usa como el conjugado de lípidos, la tasa a la que la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica puede variarse, por ejemplo, variando la concentración del conjugado de lípidos, variando el peso molecular del PEG, o variando la longitud de cadena y el grado de saturación de los grupos de cadena de acilo en la fosfatidiletanolamina o la ceramida. Además, pueden usarse otras variables que incluyen, por ejemplo, pH, temperatura, fuerza iónica, etc., para variar y/o controlar la tasa a la que la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica. Otros métodos que pueden usarse para controlar la tasa a la que la partícula de ácido nucleico-lípido llega a ser fusogénica serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de la presente divulgación.

VI. Preparación de partículas de lípidos

Las partículas de lípidos descritas en el presente documento, por ejemplo, SNALP, en las que un agente activo o agente terapéutico tal como un ARN interferente se encapsula en una bicapa lipídica y se protege de la degradación, pueden formarse por cualquier método conocido en la técnica que incluye, pero no se limita a, un método de mezcla continua o un proceso de dilución directa.

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

En ciertas realizaciones, la presente divulgación proporciona SNALP producidas mediante un método de mezcla continua, por ejemplo, un proceso que incluye proporcionar una solución acuosa que comprende un ácido nucleico tal como un ARN interferente en un primer recipiente, proporcionar una solución orgánica de lípidos en un segundo recipiente, y mezclar la solución acuosa con la solución orgánica de lípidos de forma que la solución orgánica de lípidos se mezcle con la solución acuosa de manera que produzca sustancialmente instantáneamente un liposoma que encapsula el ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente). Este proceso y el aparato para llevar a cabo este proceso se describen en detalle en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20040142025.

La acción de introducir continuamente las soluciones de lípidos y de tampón en un entorno de mezcla, tal como en una cámara de mezcla, producen una dilución continua de la solución de lípidos con la solución de tampón, produciendo así un liposoma sustancialmente instantáneamente con la mezcla. Como se usa en el presente documento, la expresión "diluir continuamente una solución de lípidos con una solución de tampón" (y variaciones) generalmente significa que la solución de lípidos se diluye suficientemente rápidamente en un proceso de hidratación con fuerza suficiente para efectuar la generación de vesículas. Mezclando la solución acuosa que comprende un ácido nucleico con la solución orgánica de lípidos, la solución orgánica de lípidos se somete a dilución escalonada continua en presencia de la solución de tampón (es decir, solución acuosa) para producir una partícula de ácido nucleico-lípido.

Las SNALP formadas usando el método de mezcla continua normalmente tienen un tamaño 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 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se agregan y están opcionalmente dimensionadas para lograr un tamaño de partícula uniforme.

En otra realización, la presente divulgación proporciona SNALP producidas mediante un proceso de dilución directa que incluye formar una solución de liposomas e introducir inmediatamente y directamente la solución de liposomas en un recipiente de recogida que contiene una cantidad controlada de tampón de dilución. En aspectos preferidos, el recipiente de recogida incluye uno o más elementos configurados para agitar el contenido del recipiente de recogida para facilitar la dilución. En un aspecto, la cantidad de tampón de dilución presente en el recipiente de recogida es sustancialmente igual al volumen de solución de liposomas introducido en el mismo. Como ejemplo no limitante, una solución de liposomas en 45 % de etanol cuando se introduce en el recipiente de recogida que contiene un volumen igual de tampón de dilución dará ventajosamente partículas más pequeñas.

En otra realización más, la presente divulgación proporciona SNALP producidas mediante un proceso de dilución directa en el que un tercer recipiente que contiene tampón de dilución se acopla de forma fluida con una segunda región de mezcla. En esta realización, la solución de liposomas formada en una primera región de mezcla se mezcla inmediatamente y directamente con tampón de dilución en la segunda región de mezcla. En aspectos preferidos, la segunda región de mezcla incluye un conector en T dispuesto de manera que los flujos de solución de liposomas y el tampón de dilución se encuentren como flujos opuestos a 180°; sin embargo, pueden usarse conectores que

proporcionan ángulos más bajos, por ejemplo, de aproximadamente 27° a aproximadamente 180°. Un mecanismo de bomba suministra un flujo controlable de tampón a la segunda región de mezcla. En un aspecto, el caudal de tampón de dilución proporcionado a la segunda región de mezcla está controlado para ser sustancialmente igual al caudal de solución de liposomas introducido a la misma desde la primera región de mezcla. Esta realización permite

5 ventajosamente más control del flujo de tampón de la mezcla de dilución con la solución de liposomas en la segunda región de mezcla, y por tanto también la concentración de solución de liposomas en tampón a través del segundo proceso de mezcla. Tal control del caudal del tampón de dilución permite ventajosamente la formación de tamaño de partícula pequeño a concentraciones reducidas.

10 Estos procesos y los aparatos para llevar a cabo estos procesos de dilución directa se describen en detalle en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20070042031.

Las SNALP formadas usando el proceso de dilución directa normalmente tienen un tamaño 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 nm a aproximadamente 90 nm. Las partículas así formadas no se degradan y se dimensionan opcionalmente para lograr un tamaño de partícula uniforme.

15

Si se necesita, las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden dimensionarse por cualquiera de los métodos disponibles para dimensionar liposomas. El dimensionado puede realizarse con el fin de lograr un intervalo de tamaño deseado y distribución relativamente estrecha de tamaños de partícula.

20

Están disponibles varias técnicas para dimensionar las partículas a un tamaño deseado. Un método de dimensionado, usado para liposomas e igualmente aplicable a las presentes partículas, se describe en la patente de EE.UU. N.º 4.737.323. El sonicar una suspensión de partículas bien por sonicación en baño o por sondas produce una reducción de tamaño progresiva a partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La homogenización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar partículas más grandes en más pequeñas. En un procedimiento de homogenización típico, se recirculan partículas a través de un homogeneizador de emulsiones estándar hasta que se observan tamaños de partícula seleccionados, normalmente entre aproximadamente 60 y aproximadamente 80 nm. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula puede monitorizarse por discriminación del tamaño de partículas por haz láser convencional, o QELS.

25

30

La extrusión de las partículas a través de una membrana de policarbonato de poro pequeño o una membrana cerámica asimétrica también es un método eficaz para reducir los tamaños de partícula a una distribución de tamaño relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión se somete a ciclos a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución del tamaño de partícula deseada. Las partículas pueden extruirse a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños, para lograr una reducción gradual en el tamaño.

35

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos en las SNALP se precondensan como se describe en, por ejemplo, la solicitud de patente de EE.UU. N.º 09/744.103.

40

En otras realizaciones, los métodos comprenderán además añadir policationes no de lípido que son útiles para efectuar la lipofección de células usando las presentes composiciones. Ejemplos de policationes no de lípido adecuados incluyen bromuro de hexadimetrina (comercializado con la marca comercial POLYBRENE®, de Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina y polietilenimina. La adición de estas sales es preferentemente después de que las partículas se hayan formado.

45

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

50

55

En otras realizaciones, las relaciones de lípido a ácido nucleico (relación masa/masas) en una SNALP formada oscilarán 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

60

65

20 (20:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 15 (15:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 10 (10:1), aproximadamente 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1) o 15 (15:1). La relación de los materiales de partida también entra dentro de este intervalo.

- 5 Como se trató previamente, el conjugado de lípido puede incluir además un CPL. Una variedad de métodos generales de preparación de SNALP-CPL (SNALP que contiene CPL) se tratan en el presente documento. Dos técnicas generales incluyen la técnica de "post-inserción", es decir, inserción de un CPL en, por ejemplo, una SNALP pre-formada, y la técnica "estándar", en la que el CPL se incluye en la mezcla de lípido durante, por ejemplo, las etapas de formación de SNALP. La técnica de post-inserción produce SNALP que tiene CPL principalmente en la
- 10 cara externa de la membrana bicapa de SNALP, mientras que técnicas convencionales proporcionan SNALP que tienen CPL en tanto las caras internas como externas. El método es especialmente útil para vesículas hechas de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAA y PEG-DAG). Métodos de preparación de SNALP-CPL se enseñan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.705.385; 6.586.410; 5.981.501; 6.534.484; y 6.852.334; la publicación de patente de EE.UU. N.º 20020072121; y
- 15 la publicación PCT N.º WO 00/62813.

VII. Kits

- La presente divulgación también proporciona partículas de lípido (por ejemplo, SNALP) en forma de kit. El kit puede comprender un recipiente que está compartimentalizado para contener los diversos elementos de las partículas de lípido (por ejemplo, los agentes activos o agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos y los componentes de lípido individuales de las partículas). En algunas realizaciones, el kit puede comprender además un desestabilizador de membrana endosómico (por ejemplo, iones calcio). El kit normalmente contiene las composiciones de partículas de lípido de la presente divulgación, preferentemente en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación y administración.

- Como se explicó en el presente documento, las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden ser confeccionadas para dirigirse preferencialmente a tejidos, órganos, o tumores particulares de interés. En ciertos casos, el direccionamiento preferencial de partículas de lípido tales como SNALP puede llevarse a cabo controlando la propia composición de la partícula. Por ejemplo, como se expone en el Ejemplo 11, se ha encontrado que la formulación de SNALP 1:57 PEG-cDSA puede usarse para dirigir preferencialmente tumores fuera del hígado, mientras que la formulación de SNALP 1:57 PEG-cDMA puede usarse para dirigir preferencialmente el hígado (incluyendo tumores del hígado).

- En ciertos otros casos, puede desearse tener un resto de direccionamiento unido a la superficie de la partícula de lípido para potenciar adicionalmente el direccionamiento de la partícula. Métodos de unión de restos de direccionamiento (por ejemplo, anticuerpos, proteínas, etc.) a lípidos (tales como aquellos usados en las presentes partículas) son conocidos para aquellos expertos en la materia.

VII. Administración de partículas de lípido

- Una vez formadas, las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) son útiles para la introducción de agentes activos o agentes terapéuticos (por ejemplo, ácidos nucleicos tales como ARN interferente) en células. Por consiguiente, la presente invención también proporciona métodos de introducción de un agente activo o agente terapéutico tal como un ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) en una célula. Los métodos se llevan a cabo *in vitro* o *in vivo* formando primero las partículas como se ha descrito anteriormente y luego poniendo en contacto las partículas con las células durante un periodo de tiempo suficiente para que ocurra la administración del agente activo o agente terapéutico a las células.

- Las partículas de lípido descritas en el presente documento (por ejemplo, SNALP) pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula con la que se mezclan o ponen en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden o bien ser endocitosadas por una porción de las células, intercambiar lípidos con membranas celulares, o bien fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la porción de agente activo o agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) de la partícula puede tener lugar mediante una cualquiera de estas vías. En particular, cuando tiene lugar la fusión, la membrana de partícula se integra en la membrana celular y el contenido de la partícula se combina con el fluido intracelular.

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

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

5 El vehículo farmacéuticamente aceptable se añade generalmente tras la formación de partículas. Así, después de formarse la partícula, la partícula puede diluirse en vehículos farmacéuticamente aceptables tales como solución salina tamponada normal.

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

20 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden esterilizarse por técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Pueden envasarse soluciones acuosas para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, siendo la preparación liofilizada combinada con una disolución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio y cloruro de calcio. Adicionalmente, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra los daños por radicales libres y peroxidativos de lípidos con el almacenamiento. Son
25 adecuados extintores de radicales libres lipófilos, tales como alfa-tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

30 **A. Administración *in vivo***

Se ha logrado la administración sistémica para terapia *in vivo*, por ejemplo, administración de un ácido nucleico terapéutico a una célula diana distal mediante sistemas del cuerpo tales como la circulación, usando partículas de ácido nucleico-lípido tales como aquellas descritas en las publicaciones PCT N.º WO 05/007196, WO 05/121348,
35 WO 05/120152 y WO 04/002453. La presente divulgación también proporciona partículas de lípido completamente encapsuladas que protegen al ácido nucleico de la degradación por nucleasas en suero, son no inmunogénicas, son de tamaño pequeño y son adecuadas para dosificación repetida.

40 Para administración *in vivo*, la administración puede ser en cualquier modo conocido en la técnica, por ejemplo, mediante inyección, administración por vía oral, inhalación (por ejemplo, intranasal o intratraqueal), administración transdérmica, o administración rectal. La administración puede llevarse a cabo mediante dosis únicas o divididas. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral, es decir, por vía intrarticular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea o por vía intramuscular. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o por vía intraperitoneal por una inyección en bolo
45 (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.286.634). La administración intracelular de ácido nucleico también se ha tratado 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). Todavía otros métodos de administración de terapéuticos basados en lípidos se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 3.993.754; 4.145.410; 4.235.871; 4.224.179; 4.522.803; y 4.588.578. Las partículas de lípido pueden administrarse por inyección directa en el sitio de enfermedad o mediante inyección en un sitio distal del sitio de enfermedad (véase, por ejemplo, Culver, *HUMAN GENE THERAPY*, MaryAnn Liebert, Inc., Publishers, New York, pp. 70-71(1994)).

50 Las composiciones de la presente divulgación, tanto solas como en combinación con otros componentes adecuados, pueden prepararse en formulaciones en aerosol (es decir, pueden ser "nebulizadas") para ser administradas mediante inhalación (por ejemplo, por vía intranasal o por vía intratraqueal) (véase, Brigham et al., *Am. J. Sci.*, 298:278 (1989)). Las formulaciones en aerosol pueden disponerse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares.

60 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por esprays intranasales, inhalación y/u otros vehículos de administración de aerosol. Métodos de administración de composiciones de ácidos nucleicos directamente a los pulmones mediante esprays nasales de aerosol se han descrito, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. N.º 5.756.353 y 5.804.212. Asimismo, la administración de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales y compuestos de lisofosfatidil-glicerol (patente de EE.UU. 5.725.871) también es muy conocida en las técnicas farmacéuticas. Similarmente, la administración de fármaco transmucosa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de EE.UU. N.º 5.780.045.

Formulaciones adecuadas para la administración parenteral, tales como, por ejemplo, por vías intrarticular (en las articulaciones), intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal y subcutánea, incluyen soluciones acuosas y no acuosas para inyección estéril isotónica, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, espesantes, estabilizadores y conservantes. En la práctica de la presente invención, las composiciones se administran preferentemente, por ejemplo, por infusión intravenosa, por vía oral, por vía tópica, por vía intraperitoneal, por vía intravesical, o por vía intratecal.

Generalmente, cuando se administran por vía intravenosa, las formulaciones de partículas de lípido se formulan con un vehículo farmacéutico adecuado. Muchos vehículos farmacéuticamente aceptables pueden emplearse en las composiciones y métodos de la presente divulgación. Formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17^a ed. (1985). Puede usarse una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4 %, 0,3 % de glicina, y similares, y pueden incluir glucoproteínas para estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Generalmente, se empleará solución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM) como el vehículo farmacéuticamente aceptable, pero serán suficientes otros vehículos adecuados. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización de liposomas convencionales, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato de sodio, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitano, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones pueden esterilizarse usando las técnicas citadas anteriormente o, alternativamente, pueden producirse en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso o filtrarse bajo condiciones asépticas y liofilizarse, siendo la preparación liofilizada combinada con una disolución acuosa estéril antes de la administración.

En ciertas aplicaciones, las partículas de lípido desveladas en el presente documento pueden administrarse mediante administración por vía oral al individuo. Las partículas pueden incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, píldoras, pastillas para chupar, elixires, enjuague bucal, suspensiones, esprays orales, jarabes, obleas, y similares (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 5.641.515, 5.580.579 y 5.792.451). Estas formas de dosificación orales también pueden contener los siguientes: aglutinantes, gelatina; excipientes, lubricantes y/o aromatizantes. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos anteriormente, un vehículo líquido. Pueden estar presentes diversos otros materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma de dosificación unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades empleadas.

Normalmente, estas formulaciones orales pueden contener al menos aproximadamente el 0,1 % de las partículas de lípido o más, aunque el porcentaje de las partículas puede, por supuesto, variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente el 1 % o el 2 % y aproximadamente el 60 % o el 70 % o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil puede prepararse de tal forma que se obtenga una dosificación adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. Factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, estabilidad en almacén del producto, además de otras consideraciones farmacológicas, serán contemplados por un experto en la materia de la preparación de tales formulaciones farmacéuticas, y como tal, puede ser deseable una variedad de dosificaciones y pautas de tratamiento.

Las formulaciones adecuadas para administración por vía oral pueden consistir en: (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz de un agente terapéutico envasado tal como ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) suspenso en diluyentes tales como agua, solución salina o PEG 400; (b) cápsulas, sobres o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un agente terapéutico tal como ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente), como líquidos, sólidos, gránulos o gelatina; (c) suspensiones en un líquido apropiado; y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, 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 de tamponamiento, agentes humidificantes, conservantes, aromatizantes, colorantes, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastilla para chupar pueden comprender un agente terapéutico tal como ácido nucleico (por ejemplo, ARN interferente) en un aroma, por ejemplo, sacarosa, además de pastillas que comprenden el agente terapéutico en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o emulsiones de sacarosa y goma arábiga, geles, y similares que contienen, además del agente terapéutico, vehículos conocidos en la técnica.

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

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

- 5 Los métodos de la presente divulgación pueden ponerse en práctica en una variedad de hospedadores. Hospedadores preferidos incluyen especies de mamífero, tales como primates (por ejemplo, seres humanos y chimpancés, además de otros primates no humanos), caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos y cerdos.
- 10 La cantidad de partículas administrada dependerá de la relación de agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) a lípido, el agente terapéutico particular (por ejemplo, ácido nucleico) usado, la enfermedad o trastorno que está tratándose, la edad, peso y afección del paciente, y el criterio del profesional clínico, pero generalmente estará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 10^8 - 10^{10} partículas por
- 15 administración (por ejemplo, inyección).

B. Administración *in vitro*

- 20 Para aplicaciones *in vitro*, la administración de agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente) puede ser a cualquier célula cultivada en cultivo, tanto de planta como de origen animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células son células de animales, más preferentemente células de mamífero, y lo más preferentemente células humanas.

- 25 El contacto entre las células y las partículas de lípido, cuando se lleva a cabo *in vitro*, tiene lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de partículas varía ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero es generalmente entre aproximadamente 1 μ mol y aproximadamente 10 mmoles. El tratamiento de las células con las partículas de lípido 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.

- 30 En un grupo de realizaciones preferidas, una suspensión de partículas de lípido se añade a células sembradas el 60-80 % confluentes que tienen una densidad celular de aproximadamente el 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 μ g/ml, más preferentemente aproximadamente 0,1 μ g/ml.

- 35 Usando un ensayo de parámetros de liberación endosómica (ERP), puede optimizarse la eficiencia de administración de las SNALP u otra partícula de lípido descrita en el presente documento. Un ensayo de ERP se describe en detalle en la publicación de patente de EE.UU. N.º 20030077829. Más particularmente, el fin de un ensayo de ERP es distinguir el efecto de diversos lípidos catiónicos y componentes de lípidos auxiliares de SNALP basándose en su efecto relativo sobre la unión/captación o fusión con/desestabilización de la membrana endosómica. Este ensayo permite determinar cuantitativamente cómo un componente de la SNALP u otra partícula de lípido afecta la eficiencia de administración, optimizando así la SNALP u otra partícula de lípido. Normalmente, un ensayo de ERP mide la expresión de una proteína indicadora (por ejemplo, luciferasa, β -galactosidasa, proteína verde fluorescente (GFP), etc.), y en algunos casos, una formulación de SNALP optimizada para un plásmido de expresión también será apropiada para encapsular un ARN interferente. En otros casos, un ensayo de ERP puede adaptarse para medir la regulación por disminución de la transcripción o traducción de una secuencia diana en presencia o ausencia de un ARN interferente (por ejemplo, ARNip). Comparando los ERP para cada una de las diversas SNALP u otras partículas de lípido, puede determinarse fácilmente el sistema optimizado, por ejemplo, la
- 40 SNALP u otra partícula de lípido que tiene la mayor captación en la célula.

C. Células para la administración de partículas de lípido

- Las composiciones y métodos de la presente divulgación se usan para tratar una amplia variedad de tipos de células, *in vivo* e *in vitro*. Células adecuadas incluyen, por ejemplo, células precursoras (madre) hematopoyéticas, fibroblastos, queratinocitos, hepatocitos, células endoteliales, células esqueléticas y de músculo liso, osteoblastos, neuronas, linfocitos quiescentes, células terminalmente diferenciadas, células primarias lentas o no en reproducción, células del parénquima, células linfoides, células epiteliales, células óseas, y similares. En realizaciones preferidas, un agente activo o agente terapéutico tal como un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) se administra a células cancerosas tales como, por ejemplo, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de cáncer rectal, células de cáncer anal, células de cáncer de las vías biliares, 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 de hígado, células de cáncer pancreático, células de cáncer del apéndice, células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario, células de cáncer cervical, células de cáncer de próstata, células de cáncer renal, células de cáncer del sistema nervioso central, células de tumor de glioblastoma, células de cáncer de piel, células de linfoma, células de tumor de coriocarcinoma, células de cáncer de cabeza y cuello, células de tumor de sarcoma osteogénico, y células de cáncer de sangre.
- 55
- 60
- 65

La administración *in vivo* de partículas de lípido tales como SNALP que encapsulan un ARN interferente (por ejemplo, ARNip) es apta para dirigirse a células de cualquier tipo de célula. Los métodos y composiciones pueden emplearse con células de una amplia variedad de vertebrados, que incluyen mamíferos, tales como, por ejemplo, caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (por ejemplo, ratones, ratas y cobayas), lagomorfos, cerdos y primates (por ejemplo, monos, chimpancés y seres humanos).

Hasta el punto que pueda requerirse el cultivo de tejido de células, es muy conocido en la técnica. Por ejemplo, Freshney, *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3ª Ed., Wiley-Liss, New York (1994), Kuchler et al., *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Dowden, Hutchinson and Ross, Inc. (1977), y las referencias citadas en su interior proporcionan una guía general al cultivo de células. Los sistemas de células cultivadas frecuentemente estarán en forma de monocapas de células, aunque también se usan suspensiones de células.

D. Detección de partículas de lípido

En algunas realizaciones, las partículas de lípido de la presente divulgación (por ejemplo, SNALP) son detectables en el sujeto a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas. En otras realizaciones, las partículas de lípido de la presente divulgación (por ejemplo, SNALP) son detectables en el sujeto a aproximadamente 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, por detección directa de las partículas, detección de un ácido nucleico terapéutico tal como una secuencia de ARN interferente (por ejemplo, ARNip), detección de la secuencia diana de interés (es decir, detectando la expresión o expresión reducida de la secuencia de interés), o una combinación de los mismos.

1. Detección de partículas

Las partículas de lípido descritas en el presente documento, tales como SNALP, pueden detectarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, una marca puede acoplarse directa o indirectamente a un componente de la partícula de lípido usando métodos muy conocidos en la técnica. Puede usarse una amplia variedad de marcas, dependiendo la elección de la marca de la sensibilidad requerida, facilidad de conjugación con el componente de partícula de lípido, requisitos de estabilidad, e instrumentación disponible y provisiones de deposición. Marcas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, marcas espectrales tales como colorantes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína y derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Oregon Green™; rodamina y derivados tales como Texas red, isotiocianato de tetrarrodimina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™, y similares; radiomarcas tales como ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C , ^{32}P , ^{33}P , etc.; enzimas tales como peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.; marcas colorimétricas espectrales tales como oro coloidal o vidrio coloreado, o perlas de plástico tales como poliestireno, polipropileno, látex, etc. La marca puede detectarse usando cualquier medio conocido en la técnica.

2. Detección de ácidos nucleicos

Se detectan y cuantifican en el presente documento ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN interferente) por cualquiera de varios medios muy conocidos para aquellos expertos en la materia. La detección de ácidos nucleicos puede proceder por métodos muy conocidos tales como análisis Southern, análisis Northern, electroforesis en gel, PCR, radiomarcado, recuento por centelleo y cromatografía de afinidad. También puede emplearse métodos bioquímicos analíticos adicionales tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina (TLC) y cromatografía de hiperdifusión.

La selección de un formato de hibridación de ácidos nucleicos no es crítica. Los expertos en la materia conocen una variedad de formatos de hibridación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, formatos comunes incluyen ensayos de sándwich y ensayos de competición o de desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen generalmente en, por ejemplo, "Nucleic Acids Hybridization, A Practical Approach", Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985).

La sensibilidad de los ensayos de hibridación puede potenciarse mediante el uso de un sistema de amplificación de ácidos nucleicos que multiplica el ácido nucleico diana que se detecta. 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 la posterior subclonación. Ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de tales métodos de amplificación *in vitro*, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), 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); además de la patente de EE.UU. N.º 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim & Levinson (1 de octubre de 1990), C&EN 36; The Journal of NIH Research, 3:81 (1991); Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 (1989); Guatelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990); Lomell et al., J. Clin. Chem., 35:1826 (1989); Landegren et al., Science, 241:1077 (1988); Van Brunt, Biotechnology, 8:291

(1990); Wu y Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer et al., *Gene*, 89:117 (1990); y Sooknanan y Malek, *Biotechnology*, 13:563 (1995). Métodos mejorados de clonación de ácidos nucleicos amplificados *in vitro* se describen en la patente de EE.UU. N.º 5.426.039. Otros métodos descritos en la materia son la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y sistemas de Q β -replicasa. Estos sistemas pueden usarse para identificar directamente mutantes donde los cebadores de PCR o de LCR se diseñan para ser extendidos o ligados solo cuando está presente una secuencia seleccionada. Alternativamente, las secuencias seleccionadas pueden ser generalmente amplificadas usando, por ejemplo, cebadores de PCR no específicos y sondarse después la región diana amplificada para una secuencia específica indicativa de una mutación.

Ácidos nucleicos para su uso como sondas, por ejemplo, en métodos de amplificación *in vitro*, para su uso como sondas de genes, o como componentes inhibidores, normalmente se sintetizan químicamente según el método de triéster de fosoramidito en fase sólida descrito por Beaucage et al., *Tetrahedron Letts.*, 22:1859 1862 (1981), por ejemplo, usando un sintetizador automatizado, como se describe en Needham VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159 (1984). La purificación de polinucleótidos, donde sea necesario, normalmente se realiza por o bien electroforesis en gel de acrilamida nativo o por HPLC de intercambio aniónico como se describe en Pearson et al., *J. Chrom.*, 255:137 149 (1983). La secuencia de los polinucleótidos sintéticos puede verificarse usando el método de degradación química de Maxam y Gilbert (1980) en Grossman y Moldave (eds.) Academic Press, New 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 muy conocidos y generalmente se describen en Angerer et al., *Methods Enzymol.*, 152:649 (1987). En un ensayo de hibridación *in situ*, las células se fijan a un soporte sólido, normalmente un portaobjetos de vidrio. Si va a sondarse ADN, las células se desnaturalizan con calor o álcali. Las células se ponen en contacto entonces con una solución de hibridación a una temperatura moderada para permitir la hibridación de sondas específicas que se marcan. Las sondas se marcan preferentemente con radioisótopos o indicadores fluorescentes.

VIII. Ejemplos

La presente invención se describirá en mayor detalle a modo de ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen para fines ilustrativos, y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que pueden cambiarse o modificarse para dar esencialmente los mismos resultados.

Ejemplo 1. Materiales y métodos.

ARNip: Todas las moléculas de ARNip usadas en estos estudios fueron químicamente sintetizadas por la Universidad de Calgary (Calgary, AB) o Dharmacon Inc. (Lafayette, CO). Los ARNip se desalaron e hibridaron usando procedimientos convencionales.

Encapsulación en lípidos de ARNip: En algunas realizaciones, se encapsularon moléculas de ARNip en partículas de ácido nucleico-lípido compuestas de los siguiente lípidos: el conjugado de lípido PEG-cDMA (3-N-[(metoxipoli(etilenglicol)2000)carbamoil]-1,2-dimiristiloxipropilamina); el lípido catiónico DLinDMA (1,2-dilinoleiloxi-3-(N,N-dimetil)aminopropano); el fosfolípido DPPC (1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina; Avanti Polar Lipids; Alabaster, AL); y colesterol sintético (Sigma-Aldrich Corp.; St. Louis, MO) en la relación molar 1,4:57,1:7,1:34,3, respectivamente. En otras palabras, los ARNip se encapsularon en SNALP de la siguiente formulación "1:57": 1,4 % de PEG-cDMA; 57,1 % de DLinDMA; 7,1 % de DPPC; y 34,3 % de colesterol. En otras realizaciones, las moléculas de ARNip se encapsularon en SNALP libres de fosfolípidos compuestas de los siguientes lípidos: el conjugado de lípido PEG-cDMA; el lípido catiónico DLinDMA; y colesterol sintético en la relación molar 1,5:61,5:36,9, respectivamente. En otras palabras, se encapsularon los ARNip en SNALP libres de fosfolípido de la siguiente formulación "1:62": 1,5 % de PEG-cDMA; 61,5 % de DLinDMA; y 36,9 % de colesterol. Para controles de vehículo, se formaron partículas vacías con composición de lípido idénticas en ausencia de ARNip. Debe entenderse que la formulación 1:57 y la formulación 1:62 son formulaciones diana, y que la cantidad de lípido (tanto catiónico como no catiónico) presente y la cantidad de conjugado de lípido presente en la formulación pueden variar. Normalmente, en la formulación 1:57, la cantidad de lípido catiónico será el 57 % en moles $\pm$ 5 % en moles, y la cantidad de conjugado de lípido será el 1,5 % en moles $\pm$ 0,5 % en moles, estando el resto de la formulación 1:57 constituido de lípido no catiónico (por ejemplo, fosfolípido, colesterol, o una mezcla de los dos). Similarmente, en la formulación 1:62, la cantidad de lípido catiónico será el 62 % en moles $\pm$ 5 % en moles, y la cantidad de conjugado de lípido será el 1,5 % en moles $\pm$ 0,5 % en moles, estando el resto de la formulación 1:62 constituida del lípido no catiónico (por ejemplo, colesterol).

Ejemplo 2. ARNip de Eg5 formulados como SNALP 1:57 son potentes inhibidores del crecimiento celular *in vitro*.

Se prepararon formulaciones de SNALP con un ARNip que se dirige a Eg5 como el componente de ácido nucleico. Eg5 es un miembro de las proteínas relacionadas con kinesina que participan en funciones relacionadas con movimientos de orgánulos, microtúbulos o cromosomas a lo largo de microtúbulos. Estas funciones incluyen transporte axonal, deslizamiento de microtúbulos durante la fusión o división nuclear, y disyunción de cromosomas durante la meiosis y mitosis temprana. Eg5 desempeña una función crítica en la mitosis de células de mamífero. El ARNip de Eg5 usado en este estudio se proporciona en la Tabla 1. Las modificaciones implicaron introducir 2'OMe-uridina en posiciones seleccionadas en las hebras codificantes y no codificantes de la secuencia de ARNip de Eg5 2263, en la que el dúplex de ARNip contuvo menos de aproximadamente el 20 % de nucleótidos modificados con 2'OMe.

Tabla 1. Dúplex de ARNip que comprende polinucleótidos de ARN de Eg5 codificantes y no codificantes.

Modificación	Secuencia de ARNip de Eg5 2263	% modificado en 2'OMe	% modificado en la región DS
U/U	5'- CUGAAGACCUGAAGACAA dTdT-3' 3'-dTdTGAC UUCUGGACUUCUGUUA -5'	6/42 = 14,3 %	6/38 = 15,8 %
Columna 1: "U/U" = dúplex de ARNip modificado en 2'OMe-uridina; Columna 2: Los nucleótidos modificados en 2'OMe se indican en negrita y subrayados. El dúplex de ARNip puede comprender alternativa o adicionalmente nucleótidos de 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE) y/o nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA). "dT" = desoxitimidina. Columna 3: Se proporcionan el número y porcentaje de nucleótidos modificados en 2'OMe en el dúplex de ARNip. Columna 4: Se proporcionan el número y porcentaje de nucleótidos modificados en la región bicatenaria (DS) del dúplex de ARNip.			

Los componentes de lípido y las características físicas de las formulaciones de SNALP se resumen en la Tabla 2. La relación de lípido:fármaco se describe en unidades de mg de lípido total por mg de ácido nucleico. Se midieron el tamaño medio de partícula y la polidispersidad en un Malvern Instruments Zetasizer. Se midió la encapsulación de ácido nucleico usando un ensayo Ribogreen esencialmente como se describe en Heyes et al., Journal of Controlled Release, 107:276-287 (2005).

Tabla2. Características de las formulaciones de SNALP usadas en este estudio.

Muestra N.º	Composición de formulación, % en moles de PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol	Relación de lípido/fármaco	Caracterización de productos acabados		
			Tamaño (nm)	Polidispersidad	% de encapsulación
1	2 40 10 48	12,4	57	0,07	90
2	1,8 36,4 18,2 43,6	14,0	72	0,12	89
3	1,4 27,0 6,8 64,9	16,5	70	0,12	92
4	1,3 25,3 12,7 60,8	18,1	76	0,07	93
5	3,9 39,2 9,8 47,1	13,5	53	0,27	86
6	3,6 35,7 17,9 42,9	15,1	58	0,18	87
7	2,7 26,7 6,7 64,0	17,6	56	0,17	92
8	2,5 25,0 12,5 60,0	19,2	61	0,13	92
9	1,4 57,1 7,1 34,3	17,8	84	0,10	88
10	1,3 53,3 13,3 32,0	19,5	83	0,10	89
11	1,1 42,6 5,3 51,1	22,0	80	0,10	93
12	1,0 40,4 10,1 48,5	23,6	78	0,11	88
13	2,8 56,3 7,0 33,8	19,0	62	0,14	80
14	2,6 52,6 13,2 31,6	20,6	66	0,14	82
15	2,1 42,1 5,3 50,5	23,1	71	0,16	91
16	2 40 10 48	24,7	67	0,14	92

El silenciamiento de Eg5 por transfección de ARNip produce la parada mitótica y apoptosis en células de mamífero. La viabilidad celular tras la transfección con SNALP que contiene un ARNip que se dirige a Eg5 proporciona, por tanto, una lectura biológica simple de la eficiencia de transfección *in vitro*. Se evaluó la viabilidad celular de cultivos celulares *in vitro* usando el reactivo comercial CellTiter-Blue® (Promega Corp.; Madison, WI), un colorante de resazurina que se reduce por células metabólicamente activas al producto fluorogénico resorufina. La línea de células de cáncer de colon HT29 humana se cultivó usando técnicas estándar de cultivo tisular. 72 horas después de la aplicación de SNALP, se añadió el reactivo CellTiter-Blue® al cultivo para cuantificar la actividad metabólica de las células, que es una medida de la viabilidad celular. Los datos se presentan como un porcentaje de viabilidad celular con respecto a las células de control ("no tratadas") que recibieron vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS) solo.

La Figura 1 muestra que la formulación de SNALP 1:57 que contiene ARNip de Eg5 2263 U/U estaba entre los

inhibidores más potentes del crecimiento de células tumorales a todas las concentraciones de ARNip probadas (véase, Figura 1B, Muestra 9).

Ejemplo 3. ARNip de ApoB formulados como SNALP 1:57 tienen potente actividad de silenciamiento *in vivo*

Se prepararon formulaciones de SNALP con un ARNip que se dirige a apolipoproteína B (ApoB) como el componente de ácido nucleico. ApoB es la principal apolipoproteína de quilomicrones y lipoproteínas de baja densidad (LDL). Las mutaciones en ApoB están asociadas a hipercolesterolemia. ApoB se produce en el plasma en 2 formas principales, ApoB48 y ApoB100, que se sintetizan en el intestino e hígado, respectivamente, debido a un codón de terminación específico de órgano. El ARNip de ApoB usado en este estudio se proporciona en la Tabla 3. Las modificaciones implicaron introducir 2'OMe-uridina o 2'OMe-guanosina en posiciones seleccionadas en las hebras codificantes y no codificantes de la secuencia de ARNip de ApoB, en la que el dúplex de ARNip contuvo menos de aproximadamente el 20 % de nucleótidos modificados en 2'OMe.

Tabla 3. Dúplex de ARNip que comprende polinucleótidos de ARN de ApoB codificantes y no codificantes.

Posición	Modificación	Secuencia de ARNip de ApoB	% modificado en 2'OMe	% modificado en la región DS
10048	U2/2 G1/2	5'-AGUG <u>UCAUCACACUGAAUACC</u> -3' 3'-GU <u>UCACAGUAGUGUGACUU</u> AU-5'	7/42 = 16,7 %	7/38 = 18,4 %

Columna 1: El número se refiere a la posición de nucleótido de la base de 5' de la hebra codificante con respecto a la secuencia de ARNm de ApoB de ratón XM_137955. Columna 2: Los números se refieren a la distribución de modificaciones químicas de 2'OMe en cada hebra. Columna 3: Los nucleótidos modificados en 2'OMe se indican en negrita y subrayados. El dúplex de ARNip puede comprender alternativamente o adicionalmente nucleótidos de 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE) y/o nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA). Columna 4: Se proporcionan el número y porcentaje de nucleótidos modificados en 2'OMe en el dúplex de ARNip. Columna 5: Se proporcionan el número y porcentaje de nucleótidos modificados en la región bicatenaria (DS) del dúplex de ARNip.

Los componentes de lípido y las características físicas de formulaciones se resumen en la Tabla 4. La relación de lípido:fármaco se describe en unidades de mg de total lípido por mg de ácido nucleico. El tamaño de partícula medio y la polidispersidad se midieron en un Malvern Instruments Zetasizer. La encapsulación de ácido nucleico se midió usando un ensayo Ribogreen esencialmente como se describe en Heyes et al., Journal of Controlled Release, 107:276-287 (2005).

Tabla 4. Características de las formulaciones de SNALP usadas en este estudio.

Grupo	Nombre del lípido de la composición de formulación y % en moles	Relación de lípido/fármaco	Caracterización de productos acabados		
			Tamaño (nm)	Polidispersidad	% de encapsulación
2	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 2 40 10 48	12,4	59	0,15	93
3	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA Colesterol 2,2 44,4 53,3	10,7	55	0,17	91
4	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DOPC Colesterol 2 40 10 48	12,5	59	0,16	92
5	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DMPC Colesterol 2 40 10 48	12,2	56	0,11	92
6	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPE Colesterol 1,8 36,4 18,2 43,6	13,8	66	0,16	93
7	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colestanol 2 40 10 48	12,4	56	0,12	92

Grupo	Nombre del lípido de la composición de formulación y % en moles	Relación de lípido/fármaco	Caracterización de productos acabados		
			Tamaño (nm)	Polidispersidad	% de encapsulación
8	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 1,4 27,0 6,8 64,9	16,5	60	0,10	93
9	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 1,3 25,3 12,7 60,8	18,1	74	0,13	92
10	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 2,5 25,0 12,5 60,0	19,2	60	0,13	93
11	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 1,4 57,1 7,4 34,3	17,8	79	0,09	94
12	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 1,0 40,4 10,1 48,5	23,6	72	0,11	93
13	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC 2 70 28	8,7	73	0,09	87
14	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC 1,6 54,7 43,8	11,3	65	0,11	87

Se obtuvieron ratones BALB/c (hembra, al menos 4 semanas de edad) de Harlan Labs. Después de un periodo de aclimatación (de al menos 7 días), los animales se administraron con SNALP por inyección intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola una vez al día en el día de estudio 0 (1 dosis total por animal). La dosificación fue 1 mg de ARNip encapsulado por kg de peso corporal, correspondiente a 10 ml/kg (redondeado a los 10 µl más próximos). Como control negativo, se administró un grupo de animales con una inyección i.v. de vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el día de estudio 2, los animales se sacrificaron y se recogió tejido del hígado en RNAlater.

Se analizaron tejidos de hígado para niveles de ARNm de ApoB normalizado contra los niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando el ensayo QuantiGene (Panomics; Fremont, CA) esencialmente como se describe en Judge *et al.*, *Molecular Therapy*, 13:494 (2006).

La Figura 2 muestra que la formulación de SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB 10048 U2/2 G1/2 fue la más potente en reducir la expresión de ApoB *in vivo* (véase, Grupo 11).

Ejemplo 4. ARNip de ApoB formulado como SNALP 1:57 tienen potente actividad de silenciamiento *in vivo*.

Se prepararon formulaciones de SNALP con el ARNip de ApoB expuesto en la Tabla 3. Los componentes de lípido y las características físicas de las formulaciones se resumen en la Tabla 5. La relación de lípido:fármaco se describe en unidades de mg de lípido total por mg de ácido nucleico. Se midieron el tamaño de partícula medio y la polidispersidad en un Malvern Instruments Zetasizer. La encapsulación de ácido nucleico se midió usando un ensayo Ribogreen esencialmente como se describe en Heyes *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 107:276-287 (2005).

Tabla 5. Características de las formulaciones de SNALP usadas en este estudio.

SNALP (relación de L:D)	Carga de ARNip	Tamaño de partícula (polidispersidad)	% de encapsulación
2:30 (13)	ApoB-10048 U2/2 G1/2	65 nm (0,16)	88
1:57 (9)	ApoB-10048 U2/2 G1/2	74 nm (0,10)	89

La formulación de SNALP 2:30 usada en este estudio es la composición de lípido 2:30:20:48 como se describe en porcentajes molares de PEG-C-DMA, DLinDMA, DSPC y colesterol (en ese orden). Esta formulación se preparó por prensa de jeringa a una relación de lípido a fármaco (L:D) de entrada (mg:mg) de 13:1.

La formulación de SNALP 1:57 usada en este estudio es la composición de lípido 1,5:57,1:7:34,3 como se describe en porcentajes molares de PEG-C-DMA, DLinDMA, DPPC y colesterol (en ese orden). Esta formulación se preparó por prensa de jeringa a una relación de lípido a fármaco (L:D) de entrada (mg:mg) de 9:1.

- 5 Se obtuvieron ratones BALB/c (hembra, 4 semanas de edad) de Harlan Labs. Después de un periodo de aclimatación (de al menos 7 días), los animales se administraron con SNALP por inyección intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola una vez al día en los días de estudio 0, 1, 2, 3 y 4 durante un total de 5 dosis por animal. La dosificación diaria fue o bien 1,0 (para SNALP 2:30) o bien 0,1 (para SNALP 1:57) mg de ARNip encapsulado por kg de peso corporal, correspondiente a 10 ml/kg (redondeado a los 10 µl más próximos). Como control negativo, se administró un grupo de animales con inyecciones i.v. de vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el día de estudio 7, 72 h después del último tratamiento, los animales se sacrificaron y se recogió tejido del hígado en RNAlater.

- 15 Los tejidos del hígado se analizaron para niveles de ARNm de ApoB normalizados contra niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando el ensayo QuantiGene (Panomics; Fremont, CA) esencialmente como se describe en Judge *et al.*, *Molecular Therapy*, 13:494 (2006).

- 20 La Figura 3 muestra que SNALP 1:57 que contiene ARNip de ApoB 10048 U2/2 G1/2 fue más de 10 veces tan eficaz como la SNALP 2:30 en mediar en el silenciamiento del gen ApoB en hígado de ratón a un dosis 10 veces más baja.

Ejemplo 5. ARNip de ApoB formulado como 1:57 o SNALP 1:62 tienen potente actividad de silenciamiento *in vivo*.

- 25 Se prepararon formulaciones de SNALP con el ARNip de ApoB expuesto en la Tabla 3. Los componentes de lípido y las características físicas de las formulaciones se resumen en la Tabla 6. La relación de lípido:fármaco se describe en unidades de mg de lípido total por mg de ácido nucleico. Se midieron el tamaño de partícula medio y la polidispersidad en un Malvern Instruments Zetasizer. Se midió la encapsulación de ácido nucleico usando un ensayo Ribogreen esencialmente como se describe en Heyes *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 107:276-287 (2005).

- 30 Tabla 6. Características de las formulaciones de SNALP usadas en este estudio.

Grupo	Nombre del lípido de la composición de formulación y % en moles	Relación de lípido/fármaco	Caracterización de productos acabados		
			Tamaño (nm)	Polidispersidad	% de encapsulación
2	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 1,4 57,1 7,1 34,3	8,9	76	0,06	89
3	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA Colesterol 1,5 61,5 36,9	8,1	76	0,04	86
4	PEG(2000)-C-DMA DODMA DPPC Colesterol 1,4 57,1 7,1 34,3	9,0	72	0,05	95
5	PEG(5000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colesterol 1,4 57,1 7,1 34,3	9,6	52	0,16	89
6	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC Colestanol 1,4 57,1 7,1 34,3	8,9	68	0,10	94
7	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPE Colesterol 1,4 57,1 7,1 34,3	8,9	72	0,07	95
8	PEG(2000)-C-DMA DLinDMA DPPC 1,8 70,2 28,1	8,6	74	0,13	86

- 35 Se obtuvieron ratones BALB/c (hembra, al menos 4 semanas de edad) de Harlan Labs. Después de un periodo de aclimatación (de al menos 7 días), los animales se administraron con SNALP por inyección intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola una vez al día en el día de estudio 0 (1 dosis total por animal). La dosificación fue 0,75 mg de ARNip encapsulado por kg de peso corporal, correspondiente a 10 ml/kg (redondeado a los 10 µl más próximos). Como control negativo, se administró un grupo de animales con una inyección i.v. de vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el día de estudio 2, los animales se sacrificaron y se recogió tejido del hígado en

RNAlater.

Se analizaron tejidos de hígado para niveles de ARNm de ApoB normalizados contra niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando el ensayo QuantiGene (Panomics; Fremont, CA) esencialmente como se describe en Judge *et al.*, *Molecular Therapy*, 13:494 (2006).

La Figura 4 muestra que las formulaciones de SNALP 1:57 y 1:62 tuvieron actividad de silenciamiento de ApoB comparable *in vivo* (véanse, por ejemplo, los Grupos 2 y 3).

10 Ejemplo 6. ARNip de ApoB formulado como SNALP 1:62 tienen potente actividad de silenciamiento *in vivo*.

Se prepararon formulaciones de SNALP con el ARNip de ApoB expuesto en la Tabla 3. Los componentes de lípido y las características físicas de las formulaciones se resumen en la Tabla 7. La relación de lípido:fármaco se describe en unidades de mg de lípido total por mg de ácido nucleico. El tamaño de partícula medio y la polidispersidad se midieron en un Malvern Instruments Zetasizer. Se midió la encapsulación de ácido nucleico usando un ensayo Ribogreen esencialmente como se describe en Heyes *et al.*, *Journal of Controlled Release*, 107:276-287 (2005).

Tabla 7. Características de las formulaciones de SNALP usadas en este estudio.

Grupo	Composición de formulación, % en moles de PEG(2000)-C- DMA LinDMA Colesterol			Relación de lípido/fármaco	Caracterización de productos acabados		
					Tamaño (nm)	Polidispersidad	% de encapsulación
2	1,5	61,5	36,9	6,1	80	0,07	92
3	1,4	54,8	43,8	6,6	74	0,05	89
4	2,0	61,2	36,7	6,2	71	0,11	91
5	1,8	54,5	43,6	6,7	67	0,09	91
6	1,3	68,1	30,6	7,4	91	0,06	89
7	1,2	61,8	37,1	8,0	87	0,10	90
8	1,7	67,8	30,5	7,6	81	0,07	91
9	1,4	56,3	42,3	8,6	75	0,11	92
10	1,9	61,3	36,8	8,2	72	0,10	91
11	1,8	56,1	42,1	8,8	70	0,10	90
12	1,3	66,7	32,0	9,5	89	0,09	89
13	1,2	61,7	37,0	10,0	87	0,10	91
14	1,7	66,4	31,9	9,6	82	0,11	90
15	1,5	61,5	36,9	10,1	79	0,10	91

Se obtuvieron ratones BALB/c (hembra, al menos 4 semanas de edad) de Harlan Labs. Después de un periodo de aclimatación (de al menos 7 días), los animales se administraron con SNALP por inyección intravenosa (i.v.) en la vena lateral de la cola una vez al día en el día de estudio 0 (1 dosis total por animal). La dosificación fue 0,1 mg de ARNip encapsulado por kg de peso corporal, correspondiente a 10 ml/kg (redondeado a los 10 µl más próximos). Como control negativo, un grupo de animales se administró con una inyección i.v. de vehículo de solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el día de estudio 2, los animales se sacrificaron y se recogió tejido del hígado en RNAlater.

Se analizaron tejidos del hígado para niveles de ARNm de ApoB normalizados contra los niveles de ARNm de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) usando el ensayo QuantiGene (Panomics; Fremont, CA) esencialmente como se describe en Judge *et al.*, *Molecular Therapy*, 13:494 (2006).

La Figura 5 muestra que la formulación de SNALP 1:62 era uno de los inhibidores más potentes de la expresión de ApoB a dos relaciones de lípido:fármaco diferentes (es decir, 6,1 y 10,1) entre las formulaciones de SNALP libres de fosfolípido probadas (véase, Grupos 2 y 15).

35 Ejemplo 7. El silenciamiento *in vivo* de la expresión de ApoB usando SNALP 1:57 preparado mediante un proceso de prensa de jeringa o bomba de engranajes.

Este estudio ilustra una comparación de la tolerabilidad y eficacia de la formulación de SNALP 1:57 con ARNip que se dirige a ApoB como se prepara por los diversos procesos de fabricación. En particular, se preparó SNALP 1:57 por un proceso de prensa de jeringa o bomba de engranajes usando o bien PBS o bien tampón citrato (dilución después de la mezcla) y se administró por vía intravenosa en ratones.

45 Diseño experimental

Modelo animal: Ratones BALB/c hembra, 5 semanas de edad, n=4 por grupo/jaula.
Carga de ARNip: ARNip de ApoB10048 U2/2 G1/2.

Tolerabilidad:

Grupo	Formulación	Inyección i.v.	
		ARNip mg/kg	Lípido mg/kg
1	Vehículo de PBS	Volumen estándar de 10 ml/kg	
2	Dil directa en citrato 1 57, prensa de jeringa	7	77
3	Dil directa en PBS 1 57, prensa de jeringa	7	96
4	Dil directa en PBS 1 57, bomba de engranajes	7	79
5	Dil directa en citrato 1 57, prensa de jeringa	9	99
6	Dil directa en PBS 1 57, prensa de jeringa	9	123
7	Dil directa en PBS 1 57, bomba de engranajes	9	102

Eficacia:

5

Grupo	Formulación	Inyección i.v.	
		ARNip mg/kg	Lípido mg/kg
8	Vehículo de PBS	Volumen estándar de 10 ml/kg	
9	Dil directa en PBS 1 57, prensa de jeringa	0,05	0,68
10	Dil directa en PBS 1 57, bomba de engranajes	0,05	0,57
11	Dil directa en PBS 1 57, prensa de jeringa	0,1	1,36
12	Dil directa en PBS 1 57, bomba de engranajes	0,1	1,13

Formulación:

10 Las formulaciones se proporcionan a 0,005 a 0,9 mg de ARNip/ml, esterilizadas en filtro de 0,22 µm en viales de plegado superior.

Detalles de formulación:

- 15 1. La composición de lípido "Mezcla de citrato 1|57" usada en este estudio es 1,4:57,1:7,1:34,3 como se describe en porcentajes molares de PEG-C-DMA, DLinDMA, DPPC y colesterol (en ese orden). Esta formulación tiene una relación de lípido con respecto a fármaco de entrada de 8,9.
2. El equipo de bomba de engranajes incluyó un conector en T de 0,8 mm y 400 ml/min de velocidad.
3. El ARNip usado en este estudio es ARNip de ApoB-10048 U2/2 G1/2.

20 Resumen de formulación:

	1:57 (9:1) + ARNip DOW	Tamaño de partícula			L:D final (mg:mg)
		Z prom (nm)	Poli	% de encaps	
322-050807-1	Mezcla de PBS en jeringa	79	0,12	92	13,6
322-050807-2	Mezcla de citrato en jeringa	86	0,11	91	11,0
322-050807-3	Mezcla de PBS en engranajes	80	0,09	93	11,3

Procedimientos

25 **Tratamiento:** Justo antes del primer tratamiento, los animales se pesan y se calculan las cantidades de dosis basándose en el peso de animales individuales (equivalente a 10 ml/kg, redondeado a los 10 µl más próximos). El artículo de prueba se administra por inyección i.v. a través de la vena de la cola una vez en el día 0 (1 dosis total por animal). El peso corporal se mide diariamente (cada 24 h) durante la duración del estudio. Se toman diariamente

30 observaciones en el laboratorio en sintonía con las mediciones de peso corporal y adicionalmente como se garantizó.

Punto final de los grupos 1-7: Los animales se sacrifican en el día 1, 24 h después de la administración del artículo de prueba. Se recoge sangre por punción cardíaca tras el sacrificio. La cantidad completa se recoge en un SST Microtainer para suero. Coagular durante 30 (a 60) min a temp. ambiente, centrifugar durante 5 min a 16.000 x g y 16 °C, invertir para confirmar que la centrifugación está completa, y guardar a 4 °C. Analizar el panel de bioquímica

35 clínica de animales pequeños completa más AST y SDH. Lista de las principales prioridades: ALT, AST, SDH, bilirrubina, fosfatasa alcalina, GGT, BUN, CPK, glucosa. Lista de prioridades secundarias: Creatinina, albúmina, globulina, proteína total.

40 **Punto final de los grupos 8-12:** Los animales se sacrifican en el día 2, 48 h después de la administración del artículo de prueba. Se recoge sangre por punción cardíaca y se procesa para plasma. Inmediatamente, centrifugar durante 5 min a 16.000 x g (a 16 °C). Registrar cualquier observación de aspecto del plasma poco usual. Tomar con pipeta el sobrenadante de plasma claro en un tubo de microcentrífuga claro y guardar a -80 °C. Se extraen los siguientes tejidos y se pesan por separado: hígado y bazo. Se desprende la mitad inferior (no unida) del lóbulo

izquierdo del hígado y se sumerge en ≥ 5 volúmenes de RNAlater ($< 0,3$ g en 1,5 ml de RNAlater en tubo de 2,0 ml), se guarda al menos 16 horas a 4 °C antes del análisis y almacenamiento a largo plazo a -20 °C o -80 °C para fines de archivo. Se espera que las formulaciones sean bien toleradas. Los ratones que presentan signos de sufrimiento asociado al tratamiento se sacrifican a criterio del personal del vivario.

Sacrificio: Los ratones se anestesian con una dosis letal de ketamina/xilazina; entonces se realiza punción cardíaca seguido de dislocación cervical.

Análisis de datos: La tolerabilidad de la pauta de tratamiento se monitoriza por el aspecto del animal y el comportamiento, además del peso corporal. Se mide la bioquímica clínica de la sangre por analizador automatizado. Se miden niveles de ARNm de ApoB y GAPDH en hígado mediante ensayo de QG. Se mide la proteína en plasma ApoB mediante ELISA. Se mide el colesterol en plasma total mediante ensayo enzimático / colorimétrico estándar.

Resultados

No hubo pérdida de peso corporal o cambio en el aspecto / comportamiento del animal tras la administración de las formulaciones de SNALP 1:57. La Figura 6 muestra que la tolerabilidad de SNALP preparada por dilución directa en tampón citrato frente a en PBS no se diferenció significativamente en términos de parámetros de bioquímica clínica de la sangre. Hubo una diferencia de tolerabilidad entre el citrato en jeringa y el PBS en jeringa a dosificación de ARNip constante, pero esto era probablemente un artefacto dependiente de las diferentes relaciones de lípido:fármaco (L:D) finales de estas dos preparaciones.

La Figura 7 muestra que la eficacia de SNALP 1:57 preparada por bomba de engranajes fue similar a la de la misma SNALP preparada por prensa de jeringa. El perfil de tolerabilidad mejoró con el proceso de bomba de engranajes, que podría atribuirse al aumento de la tasa de encapsulación inicial y la disminución de la relación L:D final.

Ejemplo 8. El silenciamiento *in vivo* de la expresión de ApoB usando SNALP 1:57 preparada mediante una dilución directa o proceso de dilución en línea

Este estudio ilustra una comparación de la tolerabilidad y eficacia de la formulación de SNALP 1:57 con ARNip que se dirige a ApoB como se prepara por el proceso de dilución directa o dilución en línea a una relación de lípido con respecto a fármaco de entrada de 6:1 o 9:1.

Diseño experimental

Modelo animal: Ratones BALB/c hembra, 7 semanas de edad.
Carga de ARNip: ARNip de ApoB10048 U2/2 G1/2.

CBC/Dif:

Grupo	N.º de ratones	Artículo de prueba	Dosificación i.v.	
			ARNip encaps.	Lípido total
1	3	PBS	-	-
2	3	SNALP 1 57 (9:1)	7 mg/kg	71 mg/kg
3	3	SNALP 1 57 (9:1)	11 mg/kg	112 mg/kg

Bioquímica clínica:

Grupo	N.º de ratones	Artículo de prueba	Dosificación i.v.	
			ARNip encaps.	Lípido total
4	4	PBS	-	-
5	4	SNALP 1 57 (9:1)	9 mg/kg	92 mg/kg
6	4	SNALP 1 57 (9:1)	11 mg/kg	112 mg/kg
7	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	11 mg/kg	78 mg/kg
8	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	13 mg/kg	93 mg/kg
9	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	15 mg/kg	107 mg/kg
10	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	17 mg/kg	121 mg/kg
11	4	SNALP 1 57 (9:1)	11 mg/kg	112 mg/kg

Actividad:

Grupo	N.º de ratones	Artículo de prueba	Dosificación i.v.	
			ARNip encaps.	Lípido total
12	4	PBS	-	-
13	4	SNALP 1 57 (9:1)	0,05 mg/kg	0,51 mg/kg

Grupo	N.º de ratones	Artículo de prueba	Dosificación i.v.	
14	4	SNALP 1 57 (9:1)	0,1 mg/kg	1,02 mg/kg
15	4	SNALP 1 57 (9:1)	0,2 mg/kg	2,04 mg/kg
16	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	0,05 mg/kg	0,36 mg/kg
17	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	0,1 mg/kg	0,71 mg/kg
18	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	0,2 mg/kg	1,42 mg/kg
19	4	SNALP 1 57 nuevo (6:1)	0,4 mg/kg	2,85 mg/kg

Formulación:

5 Las formulaciones se proporcionan a 0,005 a 1,7 mg de ARNip/ml, esterilizadas en filtro de 0,22 µm en viales de plegado superior.

Detalles de formulación:

- 10 1. "SNALP 1|57" usado en este estudio es la composición de lípido 1,4:57,1:7,1:34,3 como se describe en porcentajes molares de PEG-C-DMA, DlinDMA, DPPC y colesterol (en ese orden). Esta formulación se preparó por bomba de engranajes a una relación de lípido con respecto a fármaco de entrada de 9:1 (lípidos 28 mM) o 6:1 (lípidos 14 mM).
2. El ARNip usado en este estudio es ARNip de ApoB-10048 U2/2 G1/2.

15 Resumen de formulación:

	SNALP 1 57 en línea con PBS en engranajes	Tamaño de partícula			L:D final (mg:mg)
		Z prom (nm)	Poli	% de encap	
322-051407-1	Entrada 9:1	78	0,07	93	10,2
322-051407-2	Entrada 6:1	81	0,05	92	7,1

Procedimientos

20 **Tratamiento:** Justo antes del primer tratamiento, los animales se pesan y se calculan las cantidades de dosis basándose en el peso de animales individuales (equivalente a 10 ml/kg, redondeado a los 10 µl más próximos). El artículo de prueba se administra por inyección i.v. a través de la vena de la cola una vez en el día 0 (1 dosis total por animal). El peso corporal se mide diariamente (cada 24 h) durante la duración del estudio. Se toman diariamente observaciones en el laboratorio en sintonía con las mediciones de peso corporal y adicionalmente como se

25 garantizó.

Punto final: Los animales se sacrifican en el día 1, 24 h después de la administración del artículo de prueba (Grupos 1-10) o en el día 2, 48 h después de la administración del artículo de prueba (Grupos 11-19).

30 **Grupos 1-3:** Se recoge sangre por punción cardíaca tras el sacrificio. La cantidad completa se recoge en un EDTA Microtainer, se mezcla inmediatamente para prevenir la coagulación, y se envía para análisis del perfil de CBC/Dif. Realizar autopsia rápida.

35 **Grupos 4-11:** Se recoge sangre por punción cardíaca en un SST Microtainer para suero. Coagular durante 30 (a 60) min a temp. ambiente, centrifugar durante 5 min a 16.000 x g y 16 °C, invertir para confirmar que la centrifugación está completa, y guardar a 4 °C. Analizar el panel de bioquímica clínica de animales pequeños completa más AST y SDH. Lista de las principales prioridades: ALT, AST, SDH, bilirrubina, fosfatasa alcalina, GGT, BUN, CPK, glucosa. Lista de prioridades secundarias: Creatinina, albúmina, globulina, proteína total. Realizar autopsia rápida.

40 **Grupos 12-19:** Se recoge sangre por punción cardíaca y se procesó para plasma: inmediatamente, centrifugar durante 5 min a 16.000 x g (a 16 °C). Registrar cualquier observación de aspecto del plasma poco usual. Tomar con pipeta el sobrenadante de plasma claro en un tubo de microcentrífuga claro y guardar a -80 °C. Se extraen los siguientes tejidos: hígado. El hígado no se pesa; se desprende la mitad inferior (no unida) del lóbulo izquierdo del hígado y se sumerge en ≥ 5 volúmenes de RNeasy Lysate (< 0,3 g en 1,5 ml de RNeasy Lysate en tubo de 2,0 ml), se guarda al

45 menos 16 horas a 4 °C antes del análisis y almacenamiento a largo plazo a -80 °C. Se espera que las formulaciones sean bien toleradas. Los ratones que presentan signos de sufrimiento asociado al tratamiento se sacrifican a criterio del personal del vivario.

50 **Sacrificio:** Los ratones se anestesian con una dosis letal de ketamina/xilazina; entonces se realiza punción cardíaca seguido de dislocación cervical.

Análisis de datos: La tolerabilidad de la pauta de tratamiento se monitoriza por el aspecto del animal y el comportamiento, y el peso corporal. Se mide la bioquímica clínica de la sangre y el perfil de CBC/Dif por analizador automatizado. Se mide de ARNm de ApoB de hígado usando el ensayo QuantiGene. Se mide ApoB-100 de plasma

usando ELISA. Se mide el colesterol en plasma total usando un ensayo enzimático estándar.

Resultados

5 Tolerabilidad:

La Figura 8 muestra que hubo muy poco efecto sobre el peso corporal 24 horas después de la administración de SNALP 1:57. La máxima pérdida de peso del $3,6 \pm 0,7$ % se observó a la mayor dosis de fármaco de 17 mg/kg. No hubo cambio obvio en el aspecto / comportamiento del animal a ninguna de las dosificaciones probadas.

10 La Figura 9 muestra que no hubo cambios obvios en la cifra de plaquetas. La reducción de plaquetas puede causar que aumente el volumen de plaquetas medio a medida que el cuerpo produce nuevas plaquetas en compensación para la disminución relacionada con el tratamiento. En las condiciones de este estudio, el volumen de plaquetas medio no cambió en los grupos tratados con SNALP.

15 La Figura 10 muestra que las elevaciones de enzimas del hígado clínicamente significativas ($3 \times \text{ULN}$) se produjeron a dosificaciones de fármaco de 11 mg/kg para SNALP 1:57 a una relación de lípido:fármaco (L:D) de 10, y a 13 mg/kg a una L:D de 7. También se observó una ligera tendencia de respuesta a la dosis hacia arriba en la proteína total en plasma y globulina.

20 Eficacia:

La Figura 11 muestra que basándose en el análisis GuantiGene de ARNm de hígado, la potencia de SNALP de L:D más baja era tan buena como la de SNALP de L:D más alta a las dosificaciones de fármaco probadas. En realidad, la actividad de silenciamiento de ApoB fue idéntica a la de las dosificaciones de 0,05 y 0,1 mg/kg. Como tal, la potencia de SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada de 6:1 (relación final de 7:1) fue similar a la potencia de SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada de 9:1 (relación final de 10:1) en reducir la expresión de ApoB.

25 La Figura 12 muestra que los niveles de proteína ApoB y de colesterol total se redujeron a un grado similar por SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada 6:1 (relación final de 7:1) y SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada de 9:1 (relación final de 10:1).

Índice terapéutico:

Este estudio demuestra que tanto SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada de 6:1 (relación final de 7:1) como SNALP 1:57 a una relación L:D de entrada de 9:1 (relación final de 10:1) causó aproximadamente el 60 % de silenciamiento de ARN de hígado de ApoB con una dosis de fármaco de 0,1 mg/kg. Interpolando a partir de los puntos de datos disponibles en la Figura 10, una relación L:D final de 10:1 a 10 mg/kg puede producir un grado similar de elevación de enzimas como una relación L:D final de 7:1 a 13 mg/kg. Usando estos puntos de actividad y toxicidad, el índice terapéutico para SNALP 1:57 a una relación L:D final de 10:1 es $(10 \text{ mg/kg}) / (0,1 \text{ mg/kg}) = 100$ y el índice terapéutico para SNALP 1:57 a una relación L:D final de 7:1 es $(13 \text{ mg/kg}) / (0,1 \text{ mg/kg}) = 130$. Usando este conjunto de datos, el índice terapéutico para SNALP 1:57 a una relación L:D final de 7:1 es el 30 % superior al índice terapéutico para SNALP 1:57 a una relación L:D final de 10:1.

45 Ejemplo 9. El silenciamiento *in vivo* de la expresión de PLK-1 usando SNALP 1:57 aumenta la supervivencia de ratones portadores de tumores Hep3B.

Se probaron ARNip de cinasa 1 similar a polo que contenía SNALP (PLK-1) (formulación 1:57 de SNALP: 1,4 % de PEG-cDMA; 57,1 % de DLinDMA; 7,1 % de DPPC; y 34,3 % de colesterol) para sus efectos sobre la supervivencia de ratones CD1 nu/nu portadores de tumores de hígado Hep3B. PLK-1 es una serina/treonina cinasa que contiene dos dominios funcionales: (1) un dominio cinasa; y (2) un dominio de caja polo (véase, por ejemplo, Barr et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 5:429-440 (2004)). La actividad y concentración celular de PLK-1 son cruciales para la regulación precisa de la división celular. PLK-1 se expresa en exceso en muchos tipos de cáncer que incluyen hepatoma y cáncer de colon, y la expresión de PLK-1 frecuentemente se correlaciona con mal pronóstico del paciente. La expresión en exceso de PLK-1 (no mutante o inactivo para cinasas) produce multinucleación (inestabilidad genética). PLK-1 hiperactivo supera el punto de regulación del daño de ADN. La expresión de PLK-1 constitutiva produce la transformación de células NIH 3T3. PLK-1 fosforila el supresor de tumor p53, inhibiendo así los efectos pro-apoptóticos de p53. El ARNip de PLK-1 usado en este estudio se proporciona en la Tabla 8. Las modificaciones implicaron introducir 2'OMe-uridina o 2'OMe-guanosina en posiciones seleccionadas en las hebras codificantes y no codificantes de la secuencia de ARNip de PLK-1, en la que el dúplex de ARNip contuvo menos de aproximadamente el 20 % de nucleótidos modificados en 2'OMe.

Tabla 8. Dúplex de ARNip que comprenden polinucleótidos de ARN de PLK-1 codificantes y no codificantes.

ARNip	Secuencia de ARNip de PLK-1		% modificado en región DS
PLK1424 U4/GU	5'-AGA <u>U</u> CACCCUCCU <u>U</u> CAAAUANN-3'	(SEQ ID NO.57)	6/38 = 15,8 %
	3'-NNUCUAGUGGGAGGAAUUUAU-5'	(SEQ ID NO.54)	

ARNip	Secuencia de ARNip de PLK-1		% modificado en región DS
PLK1424 U4/G	5'-AGA <u>UCACCCUCCU</u> UAAAUANN-3'	(SEQ ID NO.57)	7/38 = 18,4 %
	3'-NNUCUAGUGGAGGAUUUUUAU-5'	(SEQ ID NO.56)	

Columna 1: El número después de "PLK" se refiere a la posición del nucleótido de la base 5' de la hebra codificante con respecto al codón de iniciación (ATG) de la secuencia de ARNm de PLK-1 humana NM_005030. Columna 2: Nucleótidos de 2'-O-metil (2'OMe) se indican en negrita y subrayados. El dúplex de ARNip puede comprender alternativamente o adicionalmente nucleótidos de 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), 2'-desoxi-nucleótidos, nucleótidos de 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE) y/o nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA). N = nucleótido de desoxitimidina (dT), ribonucleótido de uridina (U), o ribonucleótido que tiene complementariedad con la secuencia diana o la hebra complementaria del mismo. Columna 3: Se proporcionan el número y porcentaje de nucleótidos modificados en la región bicatenaria (DS) del dúplex de ARNip.

Grupos experimentales

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

5

Grupo	N.º de ratones	Siembra de tumores	SNALP	N.º de ratones	Dosis de SNALP i.v.	Dosis de SNALP	Sacrificio	Ensayo
A	20 a semilla	I.H. 1,5x10 ⁶ Hep3B	Luc 1:57	9	Días 11, 14, 17, 21, 25, 28, 32, 35, 39, 42	10 x 2 mg/kg	Cuando están moribundos	Supervivencia Pesos corporales
B			PLK 1424 1:57	9				

Artículos de prueba

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

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

15 Procedimientos

Día 0

Los ratones recibirán Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina) inmediatamente antes de la cirugía. Se anestesian ratones individuales por inhalación de gas isoflurano y se aplicó lubricante ocular para prevenir el excesivo secado de los ojos. Aunque se mantuvieron bajo anestesia con gas de un cono nasal, se hará una única incisión de 1,5 cm a través de la línea central por debajo del esternón. Entonces se exterioriza el lóbulo hepático lateral izquierdo usando un bastoncillo de lana de algodón esterilizado en autoclave. Se inyectan 25 µl de células tumorales suspensas en PBS en el lóbulo a un ángulo bajo usando una jeringa de Hamilton de cono Luer (50 µl) y aguja de 30G (3/8"). Las células se inyectarán lentamente (~30 s) y se aplica un hisopo a la herida de punción inmediatamente después de la extracción de la aguja. Después de detenerse cualquier hemorragia (~1 min), la incisión se cierra con 5-6 suturas en la pared muscular y 3-4 grapas para la piel. Las suspensiones de células se mezclarán minuciosamente inmediatamente antes de cada inyección. Los ratones se recuperarán de la anestesia en una jaula limpia revestida con papel absorbente y se monitorizaron de cerca durante 2-4 horas. Los animales se devuelven entonces al alojamiento normal.

Día 1

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

Día 10

Los ratones se aleatorizarán en los grupos de tratamiento apropiados.

Día 11

Grupos A, B - Día 11: Todos los animales se administrarán con SNALP a 2 mg/kg por inyección i.v. mediante la vena lateral de la cola. Los ratones se dosificarán según el peso corporal (10 ml/kg). La dosis se repetirá durante 5 días consecutivos basándose en el peso inicial.

Día 14-35

Grupos A, B - Días 14, 17, 21, 25, 28, 32, 35: Todos los animales volverán a ser administrados con SNALP a 2 mg/kg por inyección i.v. mediante la vena lateral de la cola. Los ratones se dosificarán según el peso corporal (10 ml/kg).

Grupos de pesos corporales: Los ratones se pesarán en el día de la dosis durante 5 semanas, luego dos veces semanalmente hasta el cierre del estudio.

Punto final: Se espera que la carga tumoral y las formulaciones sean bien toleradas. Los ratones que presentan signos de sufrimiento asociado al tratamiento o carga tumoral se sacrifican a criterio del personal del vivario.

Sacrificio: Los ratones se anestesian con una dosis letal de ketamina/xilazina seguido de dislocación cervical.

Análisis de datos: Se ensayan supervivencia y pesos corporales.

Resultados

La Figura 13 muestra los pesos corporales medios de ratones durante la dosis terapéutica de PLK1424 SNALP en el modelo de tumor intrahepático (I.H.) Hep3B. La pauta de tratamiento fue bien tolerada sin signos evidentes de toxicidad relacionada con el tratamiento.

La Figura 14 muestra que el tratamiento con PLK1424 formulado con SNALP 1:57 causó un aumento significativo en la supervivencia de ratones portadores de tumores Hep3B. Este efecto antitumoral *in vivo* se observó en ausencia de cualquier toxicidad aparente o estimulación inmunitaria.

Ejemplo 10. El silenciamiento *in vivo* de la expresión de PLK-1 usando SNALP 1:57 induce la apoptosis de células tumorales en ratones portadores de tumores Hep3B.

Los objetivos de este estudio fueron los siguientes:

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

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

Grupos experimentales

Se sembraron 20 ratones SCID/beige del siguiente modo:

Grupo	N.º de ratones	Siembra de tumores	SNALP	N.º de ratones	Dosis de SNALP i.v.	Sacrificio	Ensayo
A	20 a semilla	I.H. 1x10 ⁶ Hep3B	PBS	6	1 x 2 mg/kg Día 20	24 h después del tratamiento	QG de tumor RACE-PCR de tumor Histopatología
B			Luc 1:57	7			
C			PLK 1424 1:57	7			

Artículos de prueba

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

Grupo	Descripción del artículo de prueba
A	PBS
B	Luc U/U SNALP 1:57
C	PLK1424 U4/GU SNALP 1:57

Procedimientos

Día 0

Los ratones recibirán Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina) inmediatamente antes de la cirugía. Se anestesian ratones individuales por inhalación de gas isoflurano y se aplicó lubricante ocular para prevenir el excesivo secado de los ojos. Aunque se mantuvieron bajo anestesia con gas de un cono nasal, se hará una única incisión de 1,5 cm a través de la línea central por debajo del esternón. Entonces se exterioriza el lóbulo hepático lateral izquierdo usando un bastoncillo de lana de algodón esterilizado en autoclave. Se inyectan 25 µl de células tumorales suspensas en PBS en el lóbulo a un ángulo bajo usando una jeringa

de Hamilton de cono Luer (50 µl) y aguja de 30G (3/8"). Las células se inyectarán lentamente (~30 s) y se aplica un hisopo a la herida de punción inmediatamente después de la extracción de la aguja. Después de detenerse cualquier hemorragia (~1 min), la incisión de la pared muscular se cierra con 5-6 suturas. La incisión de la piel se cierra entonces con 3-4 grapas metálicas para piel. Las suspensiones de células se mezclarán minuciosamente inmediatamente antes de cada inyección. Los ratones se recuperarán de la anestesia en un jaula limpia revestida con papel absorbente y se monitorizarán de cerca durante 2-4 horas. Los animales se devuelven entonces al alojamiento normal.

Día 1 Todos los ratones serán ligeramente anestesiados por gas isoflurano y se examinarán las suturas. Los animales recibirán entonces Anafen por inyección SC (100 µg en 20 µl de solución salina).

Día 7 Los ratones se aleatorizarán en los grupos de tratamiento apropiados.

Día 20 **Grupos A-C:** Los ratones se pesarán y entonces se administrarán o bien con PBS, Luc, o bien PLK1424 SNALP por inyección i.v. mediante la vena lateral de la cola. SNALP se dosificará a 2 mg/kg o volumen equivalente (10 ml/kg) según el peso corporal.

Día 21 **Grupos A-C:** Todos los ratones se pesarán y entonces se sacrificarán por anestesia letal. Los lóbulos del hígado portadores de tumor de todos los ratones en cada grupo se pesarán y recogerán en RNALater para análisis de ARN.

Punto final: Se espera que la carga tumoral y las formulaciones sean bien toleradas. Los ratones que presentan signos de sufrimiento asociado al tratamiento o carga tumoral se sacrifican a criterio del personal del vivario.

Sacrificio: Los ratones se anestesian con una dosis letal de ketamina/xilazina seguido de dislocación cervical.

Análisis de datos: Análisis de ARNm de tumores del hígado por ensayo de ADNr (QG) y RACE-PCR.

Apoptosis de células tumorales por histopatología.

Resultados

5 Se monitorizaron los pesos corporales del día 14 en adelante para evaluar la progresión del tumor. En el día 20, se aleatorizaron los 6 ratones que mostraron la mayor pérdida de peso en cada uno de los 3 grupos y se trataron. Los seis ratones tuvieron tumores I.H. sustancialmente grandes en el sacrificio (día 21). El tratamiento de los 14 ratones restantes se inició, por tanto, en el día 21 (día de sacrificio 22). 10/14 ratones tuvieron tumores sustanciales; 2/14 ratones tuvieron tumores pequeños/probables; y 2/14 ratones no tuvieron carga tumoral visible.

10 La Figura 15 muestra datos de ensayos QuantiGene usados para medir niveles de ARNm de PLK-1 específicos (de tumor) humanos. Una única dosis de 2 mg/kg de SNALP 1:57 redujo los niveles de ARNm de PLK-1 aproximadamente el 50 % en tumores Hep3B intrahepáticos que crecían en ratones.

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

20 La Figura 17 muestra la histología del tumor Hep3B en ratones tratados con o bien Luc SNALP (arriba) o bien PLK1424 SNALP (abajo). Los ratones tratados con Luc SNALP presentaron mitosis normales en tumores Hep3B, mientras que los ratones tratados con PLK1424 SNALP presentaron numerosas mitosis anómalas y apoptosis de células tumorales en tumores Hep3B.

Conclusión

25 Este ejemplo ilustra que una única administración de PLK1424 SNALP 1:57 a ratones portadores de tumores Hep3B indujo un significativo silenciamiento *in vivo* de ARNm de PLK-1. Se confirmó que esta reducción en ARNm de PLK-1 estaba mediada por interferencia por ARN usando análisis por 5' RACE-PCR. Y, lo que es más importante, el silenciamiento de ARNm de PLK-1 por la formulación de SNALP 1:57 alteró profundamente la proliferación celular del tumor (mitosis), causando la posterior apoptosis de células tumorales. Como se demuestra en el ejemplo previo, este efecto antitumoral se tradujo en tiempos de supervivencia prolongados en los ratones portadores de tumor.

Ejemplo 11. Comparación de SNALP 1:57 PLK-1 que contiene o bien PEG-cDMA o bien PEG-cDSA en un modelo de tumor Hep3B subcutáneo.

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

en la Tabla 8.

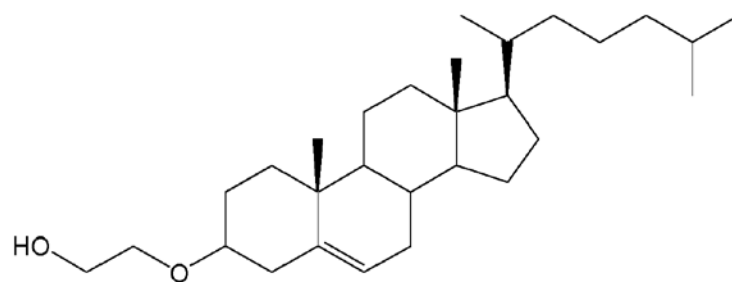
- Se establecieron tumores Hep3B subcutáneos (S.C.) en ratones Scid/beis. Se evaluó la eficacia antitumoral multidosis de SNALP 1:57 PLK-1 para los siguientes grupos (n=5 para cada grupo): (1) "Luc-cDMA" - PEG-cDMA Luc SNALP; (2) "PLK-cDMA" - PEG-cDMA PLK-1 SNALP; y (3) "PLK-cDSA" - PEG-cDSA PLK-1 SNALP. La administración de 6 x 2 mg/kg de ARNip se inició una vez los tumores alcanzaron aproximadamente 5 mm de diámetro (día 10). La dosificación se realizó en los días 10, 12, 14, 17, 19 y 21. Los tumores se midieron por compás calibrador dos veces a la semana.
- La Figura 18 muestra que múltiples dosis de SNALP 1:57 PLK-1 que contenían PEG-cDSA indujeron la regresión de los tumores Hep3B S.C. establecidos. En particular, 5/5 tumores en los ratones tratados con PLK1-cDSA aparecieron planos, medibles solo por alteración del color en el sitio tumoral.
- La Figura 19 muestra el silenciamiento de ARNm de SNALP 1:57 PLK en tumores Hep3B S.C. tras una única administración de SNALP intravenosa. El grado de silenciamiento observado con PLK1-cDSA SNALP se correlacionó con la actividad antitumoral en el estudio multi-dosis mostrado en la Figura 18.
- El grupo tratado con Luc-cDMA SNALP, que había desarrollado grandes tumores S.C. en el día 24, se administró entonces con PLK-cDSA SNALP en los días 24, 26, 28, 31, 33 y 35. No hubo dosificación adicional de los grupos tratados con PLK-1 SNALP originales. Los resultados de este estudio de dosis cruzada con tumores establecidos grandes se proporcionan en la Figura 20, que muestra que PLK1-cDSA SNALP inhibió el crecimiento de tumores Hep3B S.C. grandes.
- Una comparación del efecto de PEG-cDMA y PEG-cDSA SNALP 1:57 en el silenciamiento de ARNm de PLK-1 se realizó usando tumores Hep3B intrahepáticos establecidos en ratones Scid/beige. Se administró una única dosis de 2 mg/kg de SNALP 1:57 PLK-1 que contenía o bien PEG-cDMA o bien PEG-cDSA por vía intravenosa. Se recogieron muestras de hígado / tumorales a las 24 y 96 horas después del tratamiento con SNALP. Control = 2 mg/kg de Luc-cDMA SNALP a las 24 horas.
- La Figura 21 muestra que PLK-cDMA SNALP y PLK-cDSA SNALP tuvieron actividades de silenciamiento similares después de 24 horas, pero que PLK-cDSA SNALP puede aumentar la duración del silenciamiento de ARNm en tumores intrahepáticos.
- La Figura 22 muestra el perfil de eliminación de sangre de SNALP 1:57 PLK-1 que contiene o bien PEG-cDMA o bien PEG-cDSA. Los prolongados tiempos de circulación en sangre observados para PLK-cDSA SNALP pueden permitir el aumento de la acumulación y actividad en sitios tumorales distales (por ejemplo, subcutánea).
- Así, este estudio muestra que la formulación de SNALP 1:57 PEG-cDSA puede usarse para direccionar preferencialmente tumores fuera del hígado, mientras que 1:57 PEG-cDMA SNALP puede usarse para dirigirse preferencialmente al hígado.

Ejemplo 12. Síntesis de colesteril-2'-hidroxietil éter

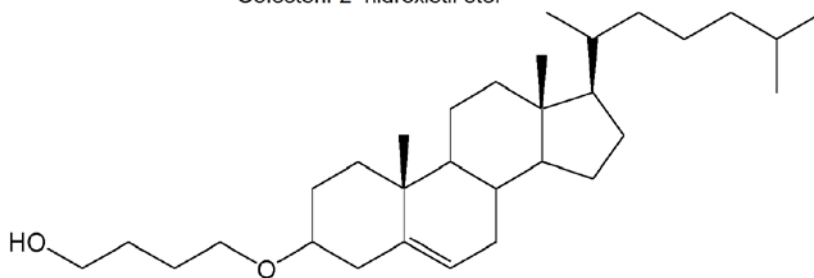
Etapa 1: Se cerró un matraz redondo de 250 ml que contenía colesterol (5,0 g, 12,9 mmoles) y una barra de agitación y se lavó con nitrógeno. Se pesó cloruro de toluenosulfonilo (5,0 g, 26,2 mmoles) en un matraz redondo de 100 ml separado, también se cerró y se lavó con nitrógeno. Se administró piridina anhidra (2 x 50 ml) a cada matraz. Entonces se transfirió la solución de cloruro de toluenosulfonilo, mediante cánula, al matraz de 250 ml, y la reacción se agitó durante la noche. La piridina se eliminó por evaporador rotatorio, y se añadió metanol (80 ml) al residuo. Éste se agitó entonces durante 1 hora hasta que se obtuvo una suspensión homogénea. La suspensión se filtró, se lavó con acetonitrilo (50 ml) y se secó a vacío dando tosilato de colesterilo como un sólido blanco esponjoso (6,0 g, 86 %).

Etapa 2: Se añadieron tosilato de colesterilo (2,0 g, 3,7 mmoles), 1,4-dioxano (50 ml) y etilenglicol (4,6 g, 74 mmoles) a un matraz de 100 ml que contenía una barra de agitación. El matraz se ajustó con un condensador, y se sometió a reflujo durante la noche. Entonces se eliminó el dioxano por evaporador rotatorio, y la mezcla de reacción se suspendió en agua (100 ml). La solución se transfirió a un embudo de decantación y se extrajo con cloroformo (3 x 100 ml). Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con agua (2 x 150 ml), se secaron sobre sulfato de magnesio, y el disolvente se eliminó. El producto en bruto se purificó por cromatografía en columna (5 % de acetona/hexano) dando el producto como un sólido blanco (1,1 g, 69 %).

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



Colesteril-2'-hidroxietil éter



Colesteril-4'-hidroxibutil éter

5 Debe entenderse que la descripción anterior pretende ser ilustrativa y no restrictiva. Muchas realizaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la lectura de la descripción anterior. El alcance de la invención debe, por tanto, determinarse no con referencia a la descripción anterior, sino que debe determinarse en su lugar con referencia a las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una partícula de ácido nucleico-lípido que comprende:

- 5 (a) un ácido nucleico;
 (b) un lípido catiónico que comprende del 50 % en moles al 65 % en moles del lípido total presente en la partícula;
 (c) un lípido no catiónico que comprende hasta el 49,5 % en moles del lípido total presente en la partícula y que comprende una mezcla de un fosfolípido y colesterol o un derivado del mismo, en el que el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % en moles al 40 % en moles del lípido total presente en la partícula; y
 10 (d) un conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas que comprende del 0,5 % en moles al 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

2. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que el ácido nucleico comprende un ARN interferente pequeño (ARNip).

3. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 2, en la que:

- 20 (a) el ARNip comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos; o
 (b) el ARNip comprende al menos un nucleótido modificado; o
 (c) el ARNip comprende al menos un nucleótido de 2'-O-metilo (2'OMe); o
 (d) el ARNip tiene aproximadamente 19 a aproximadamente 25 pares de bases en longitud; o
 (e) el ARNip comprende nucleótidos protuberantes en 3'.

25 4. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que:

- (a) el lípido catiónico comprende 1,2-dilinoileloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), o una mezcla de los mismos; o
 (b) el lípido catiónico comprende 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA); o
 30 (c) el lípido catiónico comprende del 50 % en moles al 60 % en moles del lípido total presente en la partícula; o
 (d) el lípido catiónico comprende del 52 % en moles al 62 % en moles del lípido total presente en la partícula.

5. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que:

- 35 (a) el conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas comprende un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido; o
 (b) el conjugado de lípido que inhibe la agregación de partículas comprende del 1 % en moles al 2 % en moles del lípido total presente en la partícula.

40 6. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que:

- (a) el ácido nucleico en la partícula de ácido nucleico-lípido no se degrada sustancialmente después de la incubación de la partícula en suero a 37 °C durante 30 minutos; o
 (b) el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula de ácido nucleico-lípido; o
 45 (c) la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una relación másica de lípido:ácido nucleico de aproximadamente 5 a aproximadamente 15; o
 (d) la partícula de ácido nucleico-lípido tiene una mediana del diámetro de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm.

50 7. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que:

- (a) el fosfolípido comprende dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), o una mezcla de las mismas; o
 (b) el fosfolípido comprende del 4 % en moles al 10 % en moles del lípido total presente en la partícula.

8. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 1, en la que:

- (a) el colesterol o derivado del mismo comprende del 30 % en moles al 35 % en moles del lípido total presente en la partícula; o
 60 (b) el colesterol o derivado del mismo comprende del 32 % en moles al 36 % en moles del lípido total presente en la partícula y el fosfolípido comprende del 3 % en moles al 15 % en moles del lípido total presente en la partícula.

9. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 5(a), en la que el conjugado de PEG-lípido comprende un conjugado de PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado de PEG-dialquiloxipropilo (PEG-DAA), o una mezcla de los mismos; opcionalmente en la que el conjugado de PEG-DAA comprende un conjugado de PEG-

dimiristiloxipropilo (PEG-DMA), un conjugado de PEG-diesteariloxipropilo (PEG-DSA), o una mezcla de los mismos; preferentemente en la que el PEG en el conjugado de PEG-DAA tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 2.000 daltons.

- 5 10. La partícula de ácido nucleico-lípido de la reivindicación 5(a), en la que el ácido nucleico es un ARNip y la partícula de ácido nucleico-lípido comprende aproximadamente 57,1 % en moles de lípido catiónico, aproximadamente 7,1 % en moles de fosfolípido, aproximadamente 34,3 % en moles de colesterol o un derivado del mismo, y aproximadamente 1,4 % en moles de conjugado de PEG-lípido.
- 10 11. Una composición farmacéutica que comprende una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
12. Un método de introducción de un ácido nucleico en una célula, comprendiendo el método:
15 poner en contacto la célula *in vitro* con una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, opcionalmente en el que la célula es una célula de mamífero.
13. Una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método para la administración *in vivo* de un ácido nucleico, comprendiendo el método administrar dicha partícula de ácido
20 nucleico-lípido a un sujeto mamífero.
14. La partícula de ácido nucleico-lípido para su uso según la reivindicación 13, en la que la administración está seleccionada del grupo que consiste en oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intrarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea e intradérmica.
- 25 15. Una partícula de ácido nucleico-lípido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno en un sujeto mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha partícula de ácido nucleico-lípido al sujeto mamífero, en la que la enfermedad o trastorno se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en una infección vírica, una
30 enfermedad o trastorno del hígado y cáncer.

A

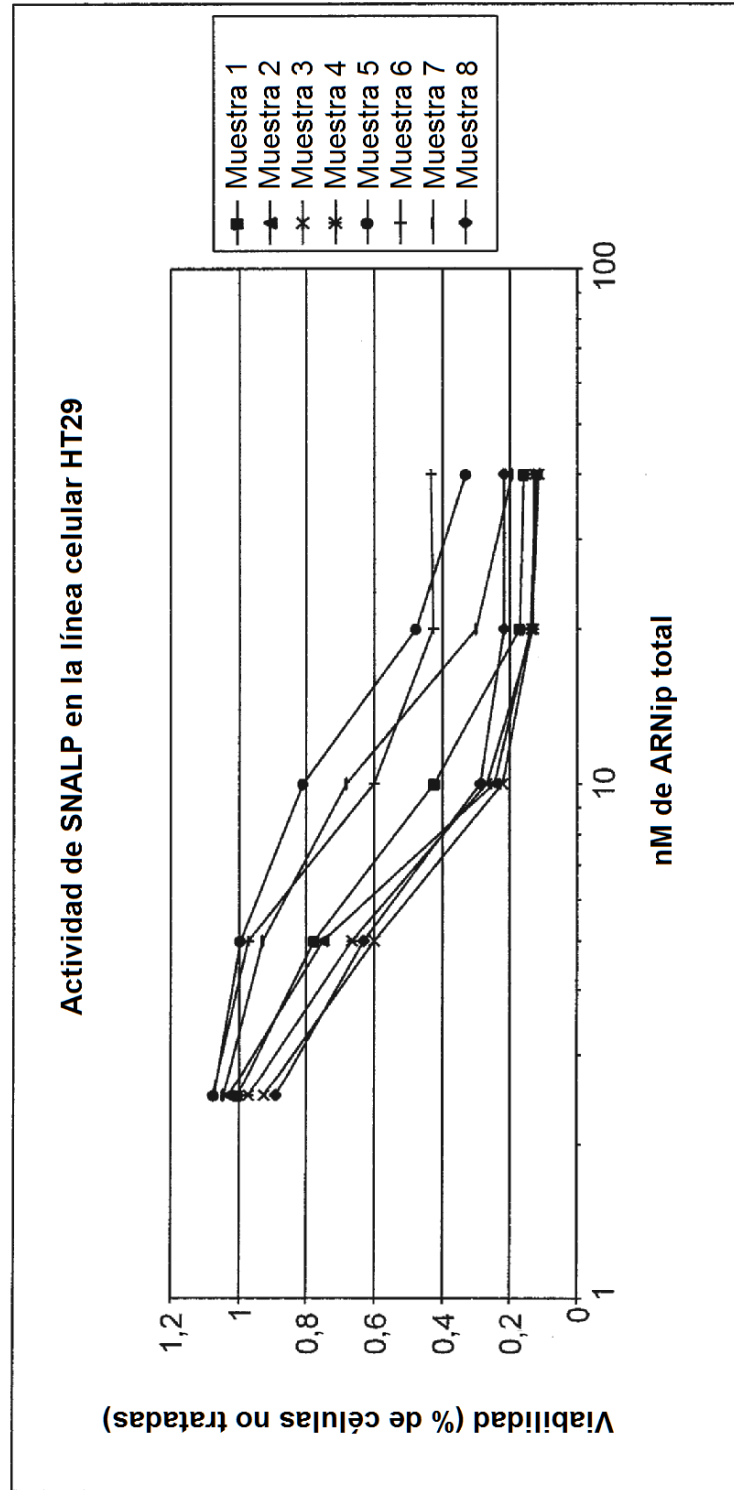


FIG. 1A

B

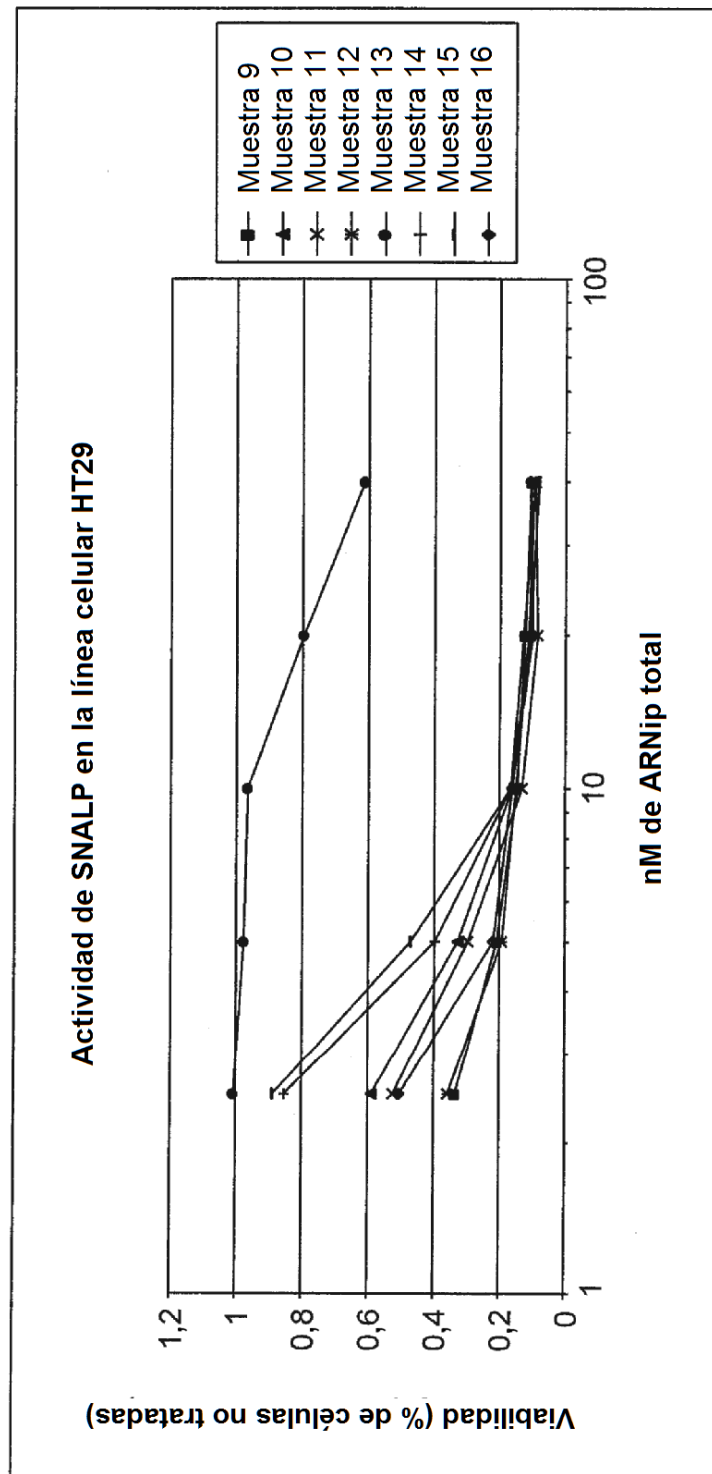


FIG. 1B

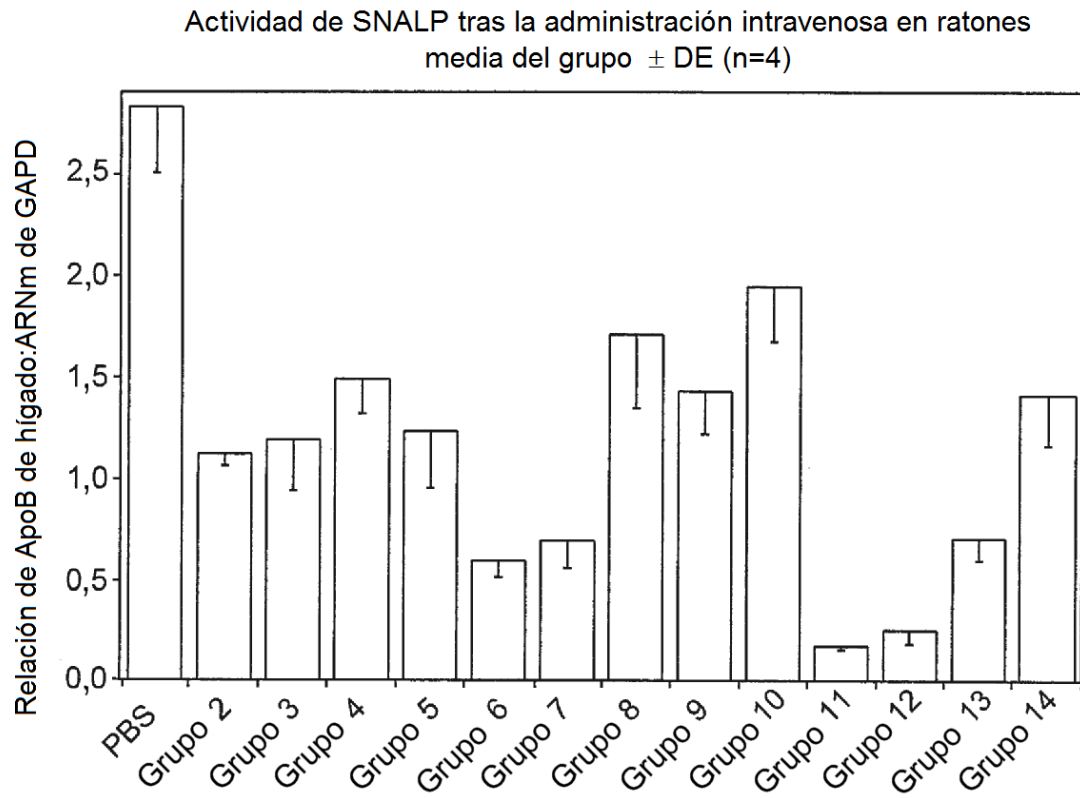


FIG. 2

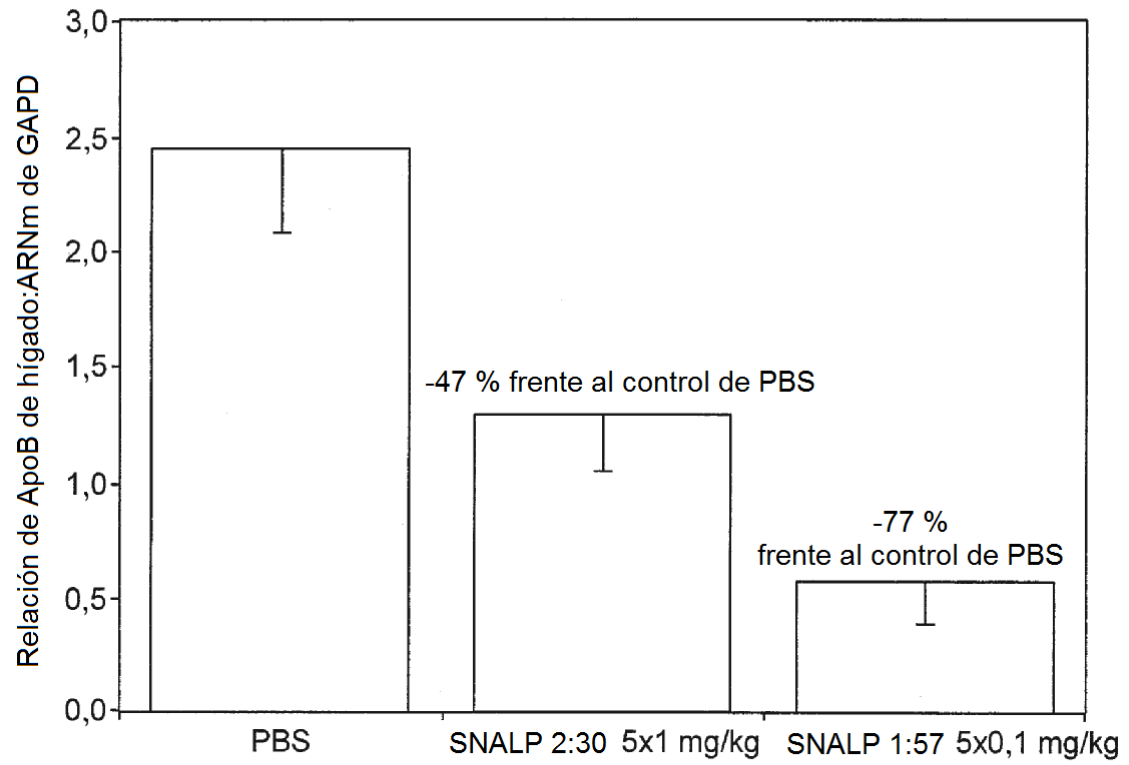


FIG. 3

Actividad de SNALP tras la administración intravenosa en ratones
media del grupo $\pm$ DE (n=4)

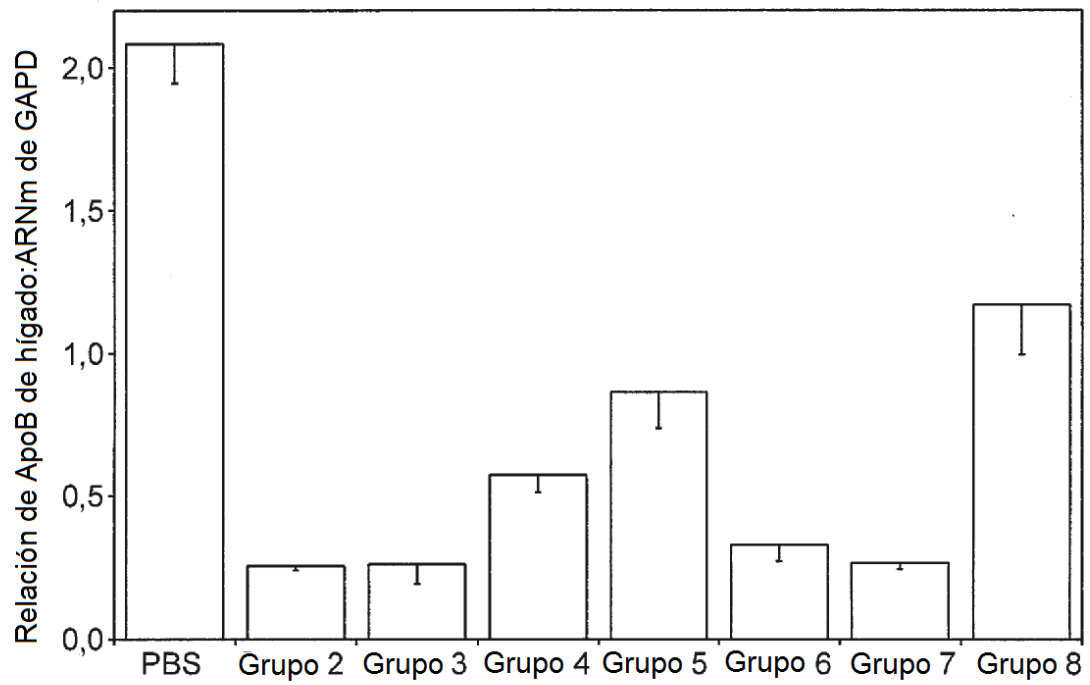


FIG. 4

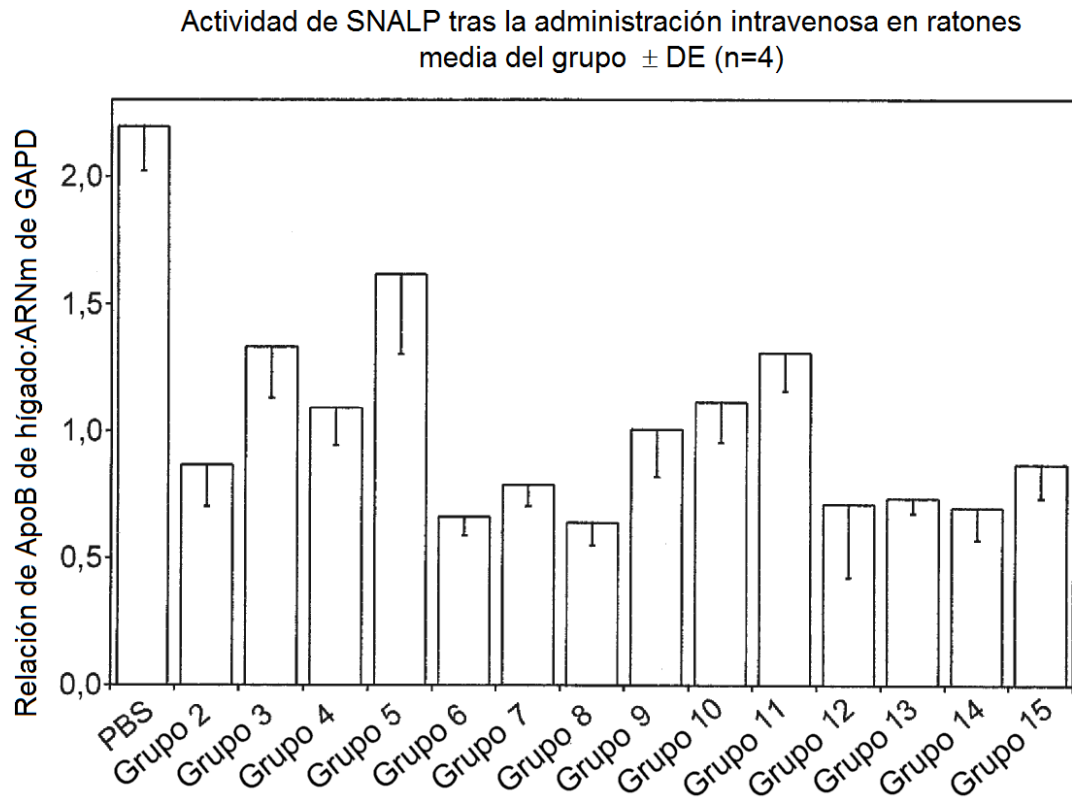


FIG. 5

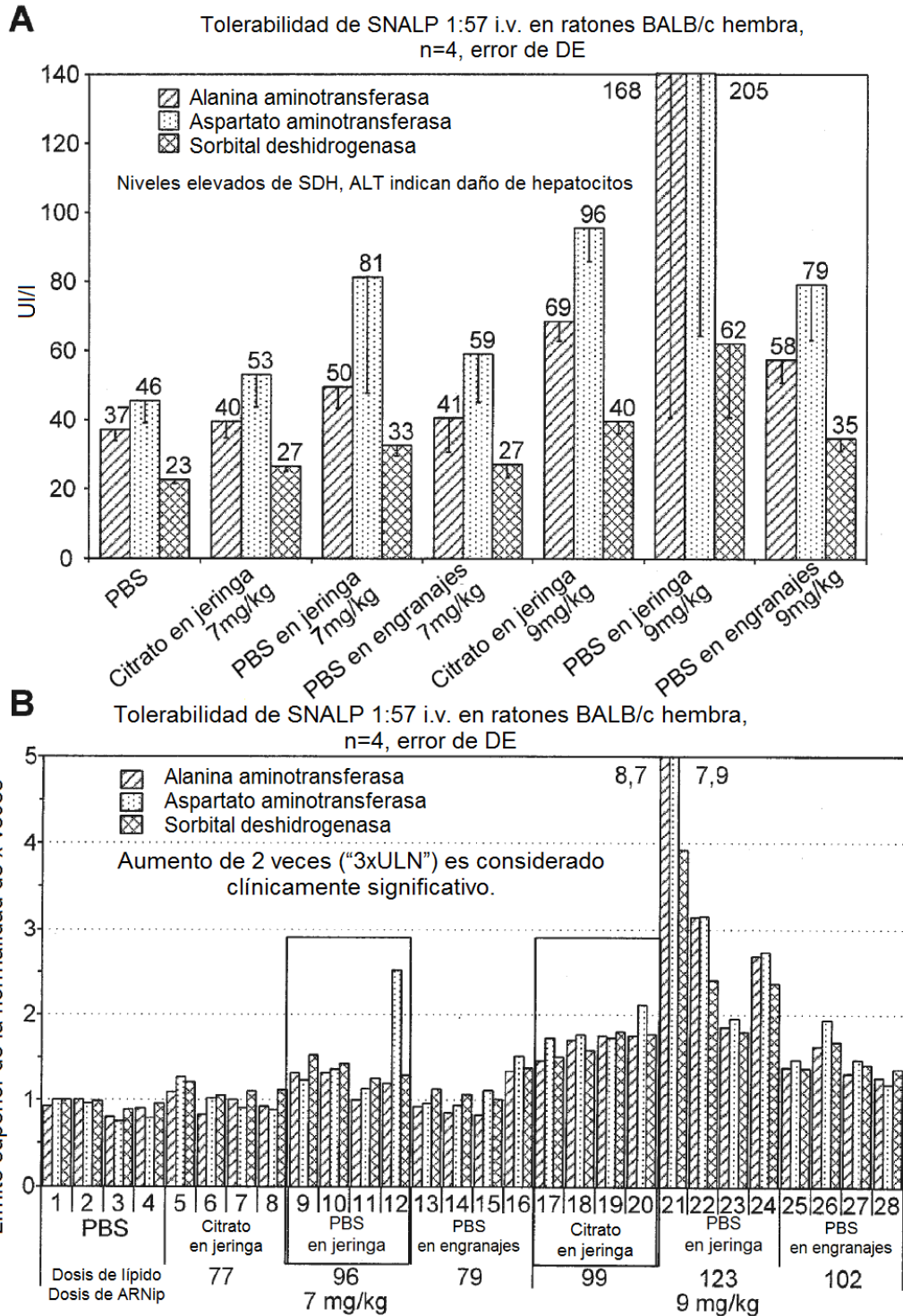


FIG. 6

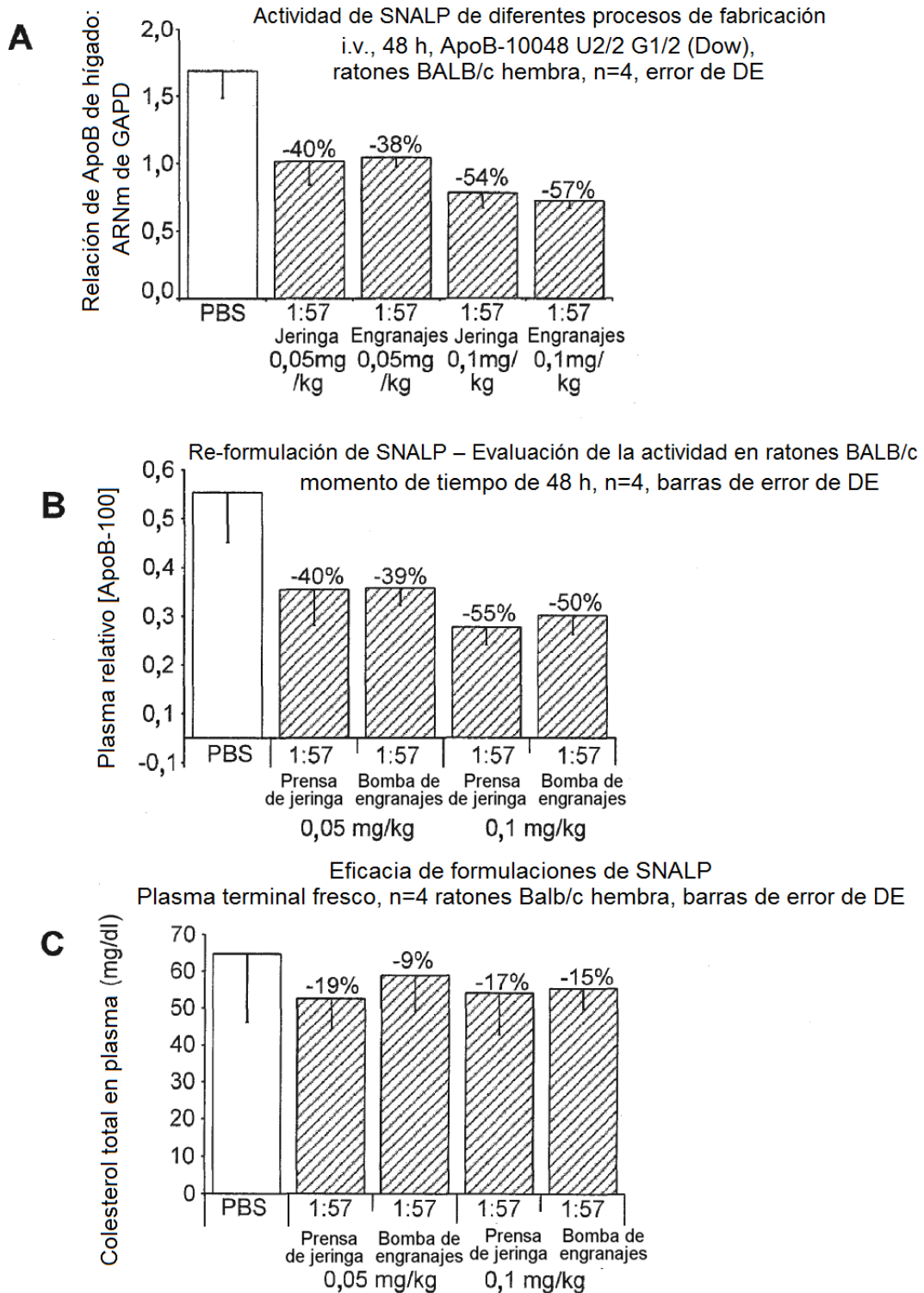


FIG. 7

Tolerabilidad de SNALP 1:57 i.v. en ratones BALB/c, n=4 (Grp 1-3, n=3), error de DE

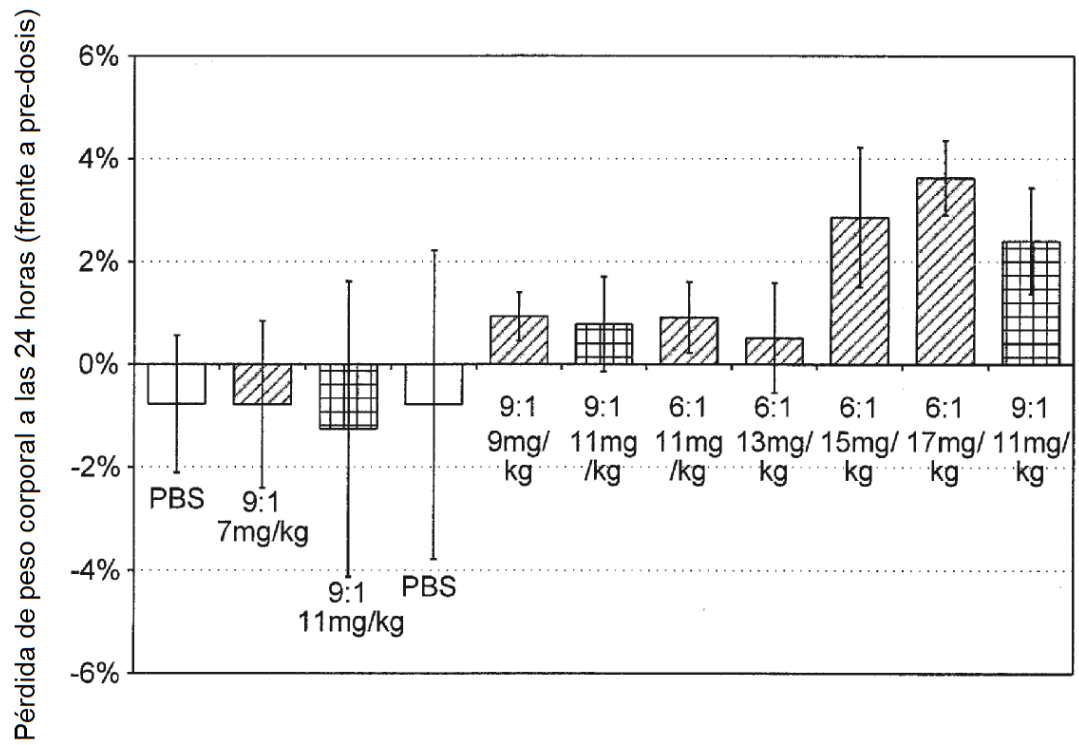


FIG. 8

Tolerabilidad de SNALP 1:57 i.v. preparado a la relación de lípido:fármaco 9:1

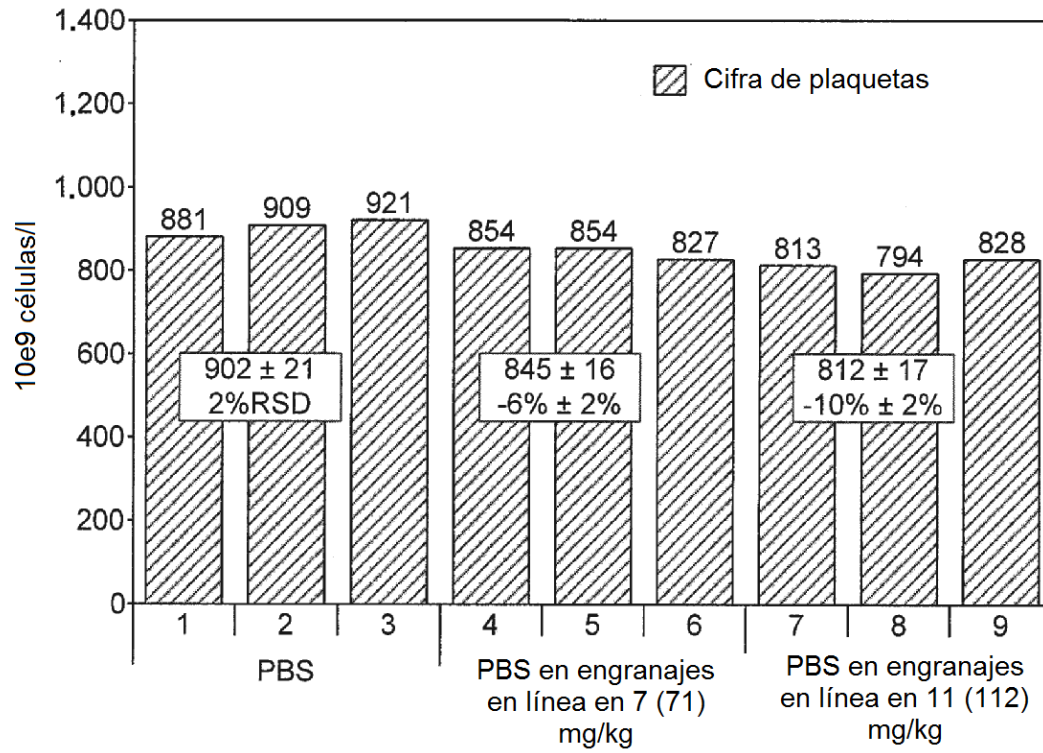
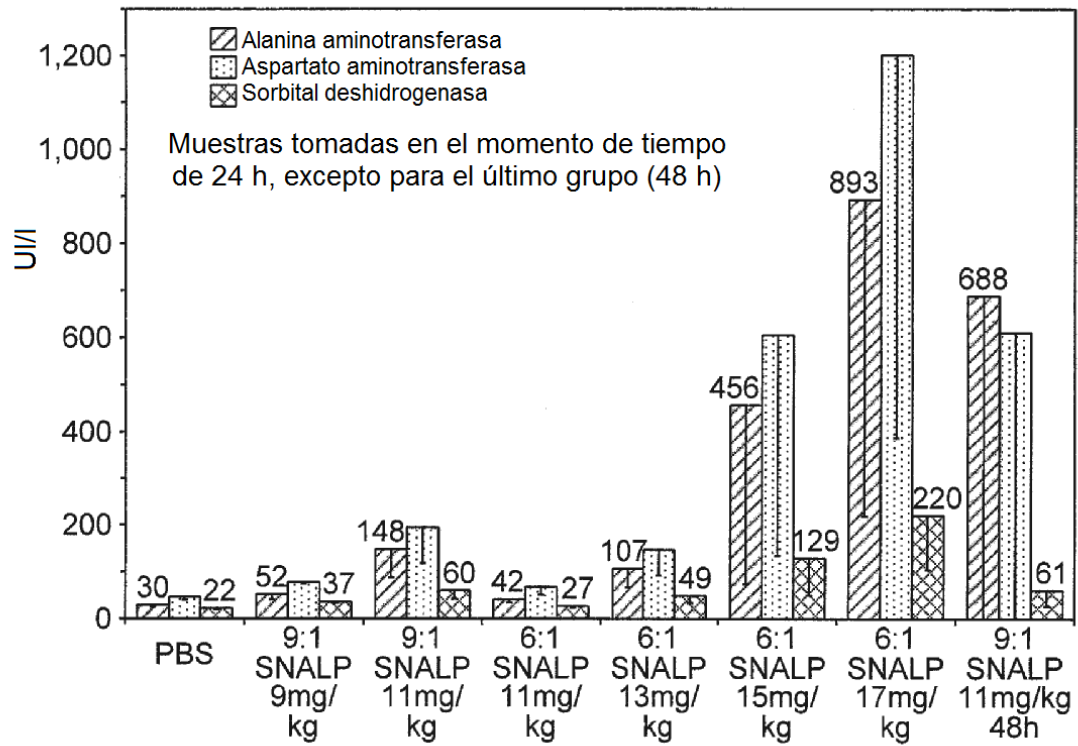


FIG. 9

A

Tolerabilidad de SNALP 1:57 en línea con PBS en engranajes i.v.
en ratones BALB/c hembra, n=4, error de DE

**FIG. 10A**

Tolerabilidad de SNALP 1:57 en línea con PBS en engranajes i.v. en ratones BALB/c hembra, n=4, error de DE

Límite superior de la normalidad de x-veces

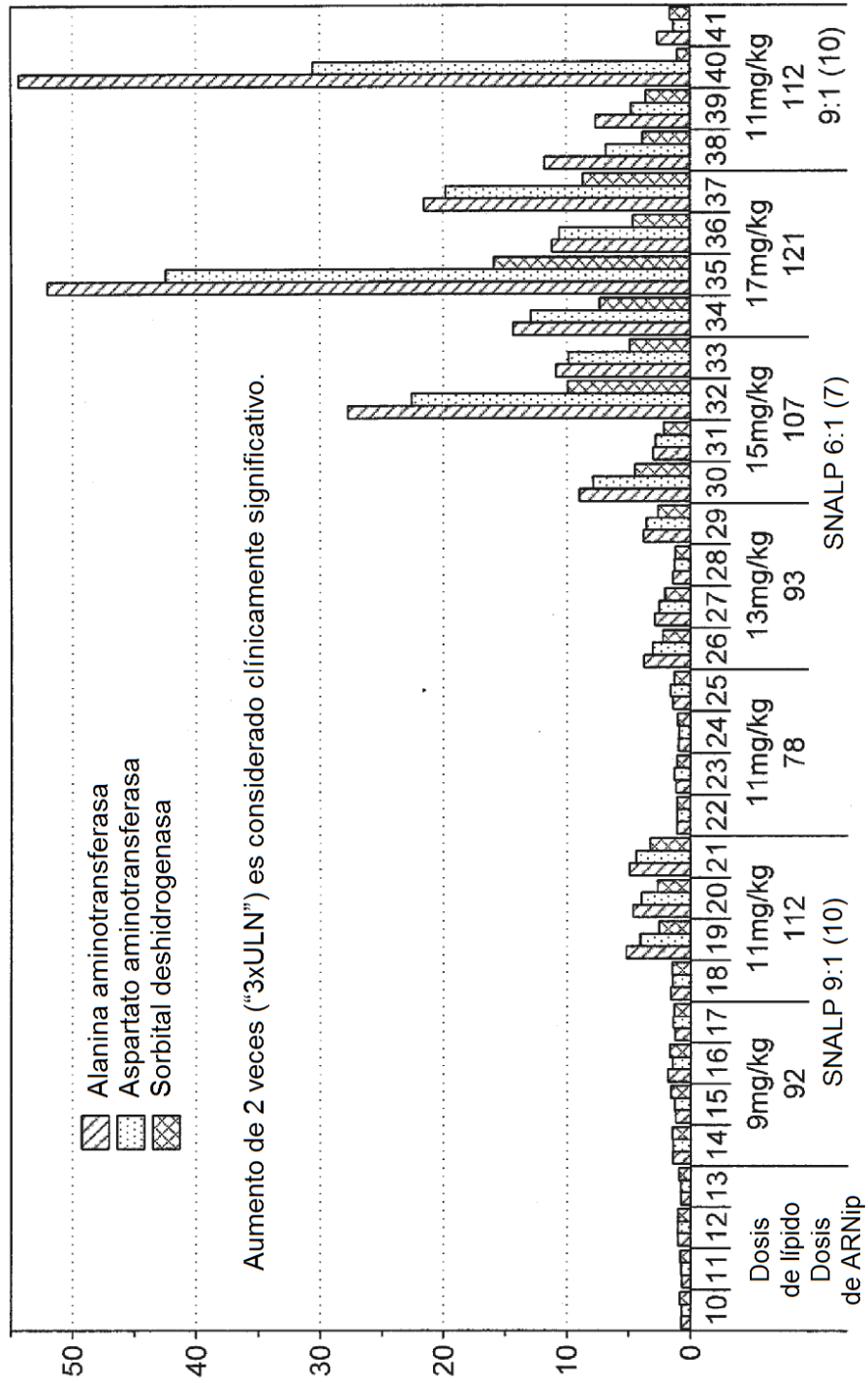


FIG. 10B

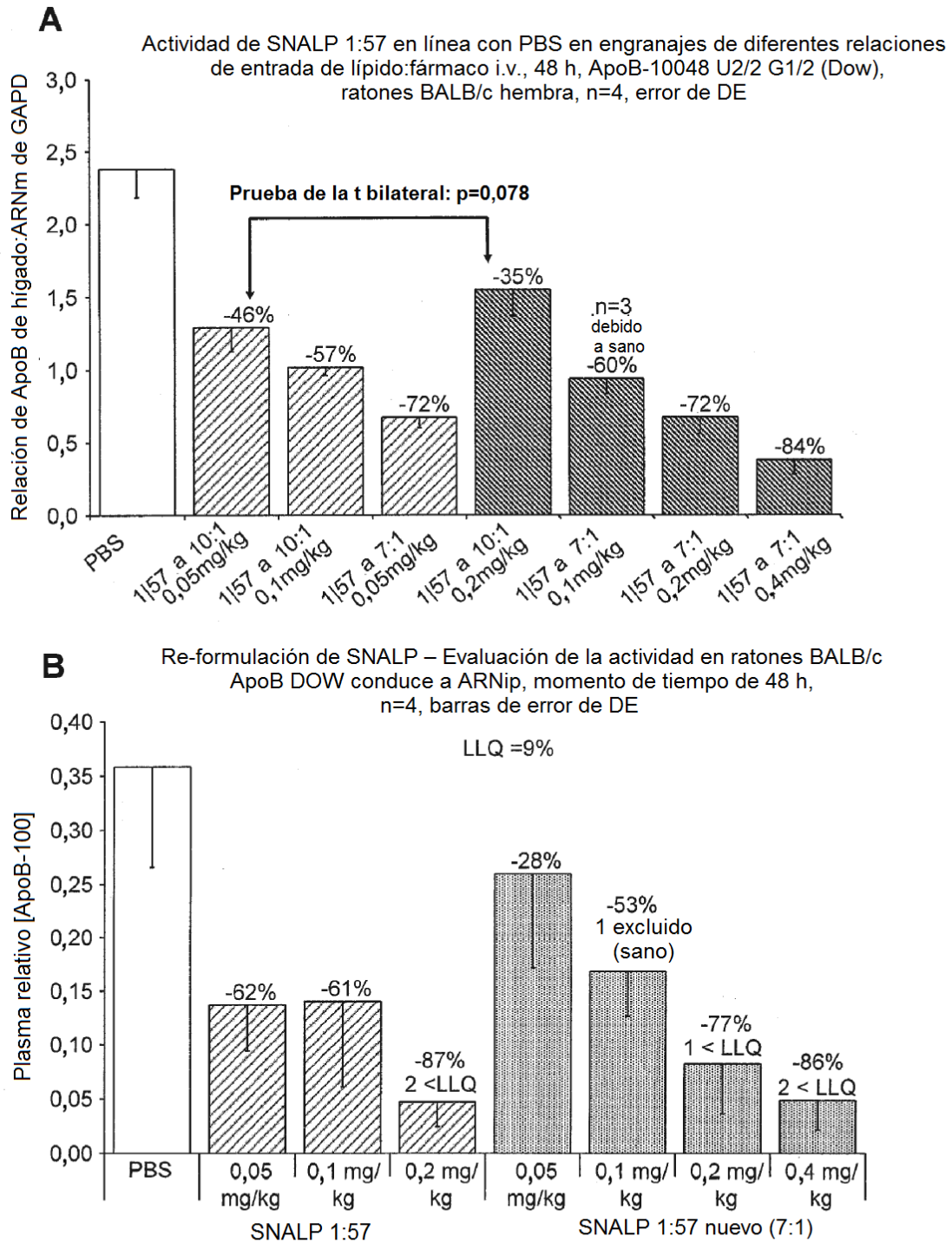


FIG. 11

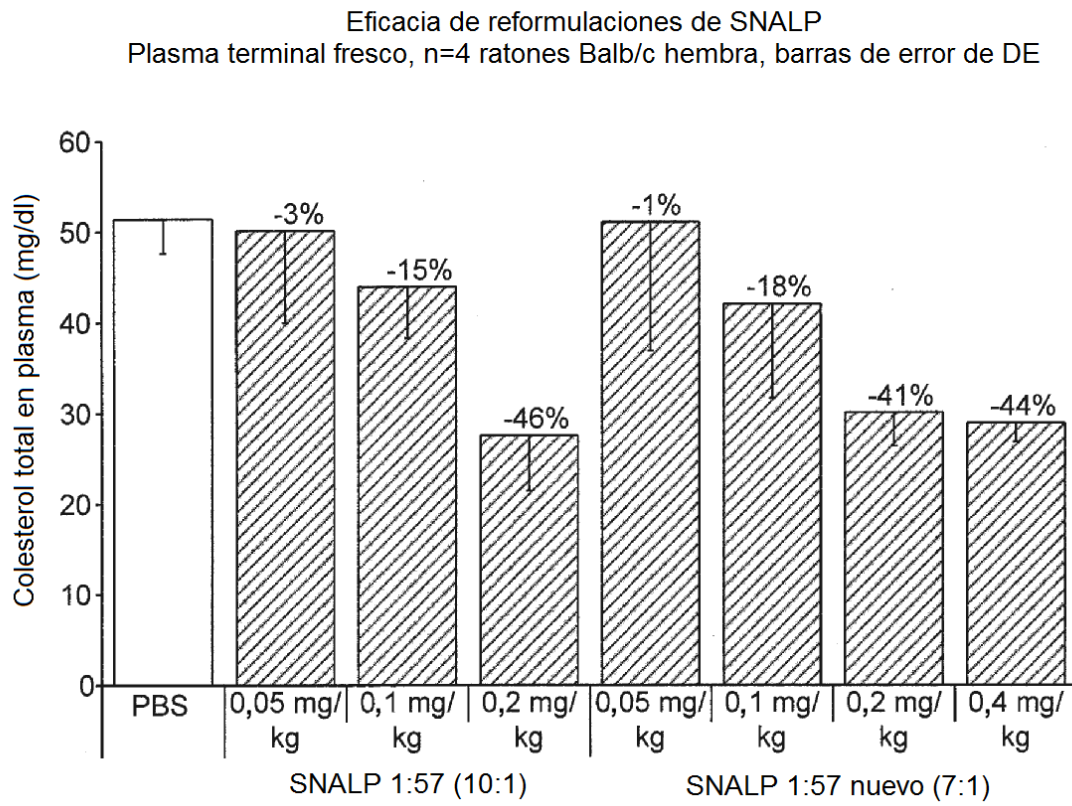


FIG. 12

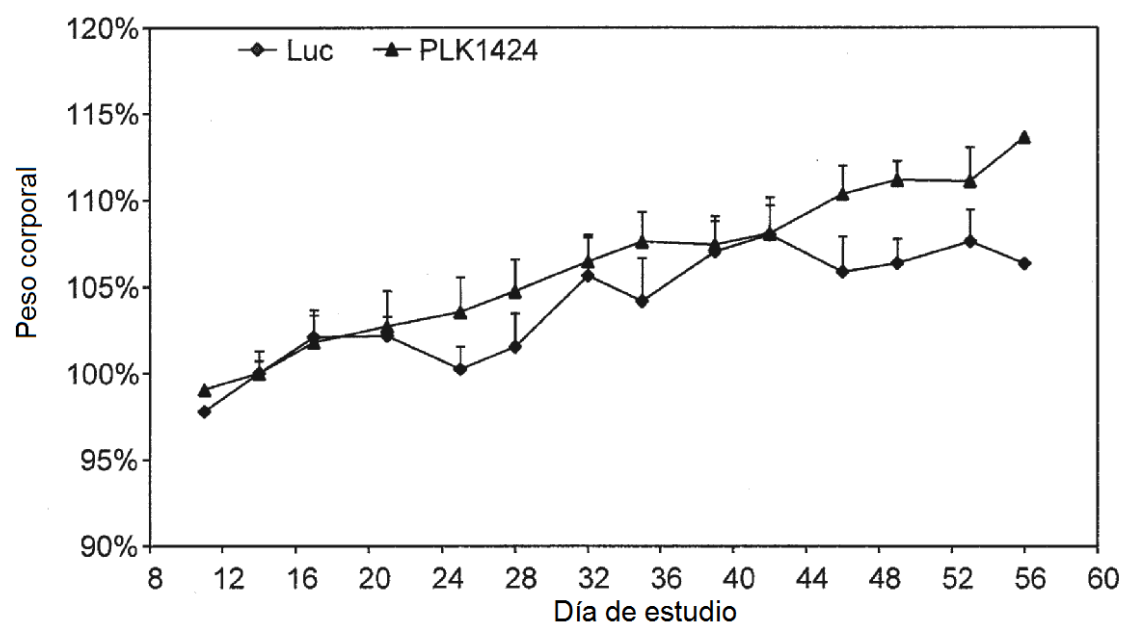


FIG. 13

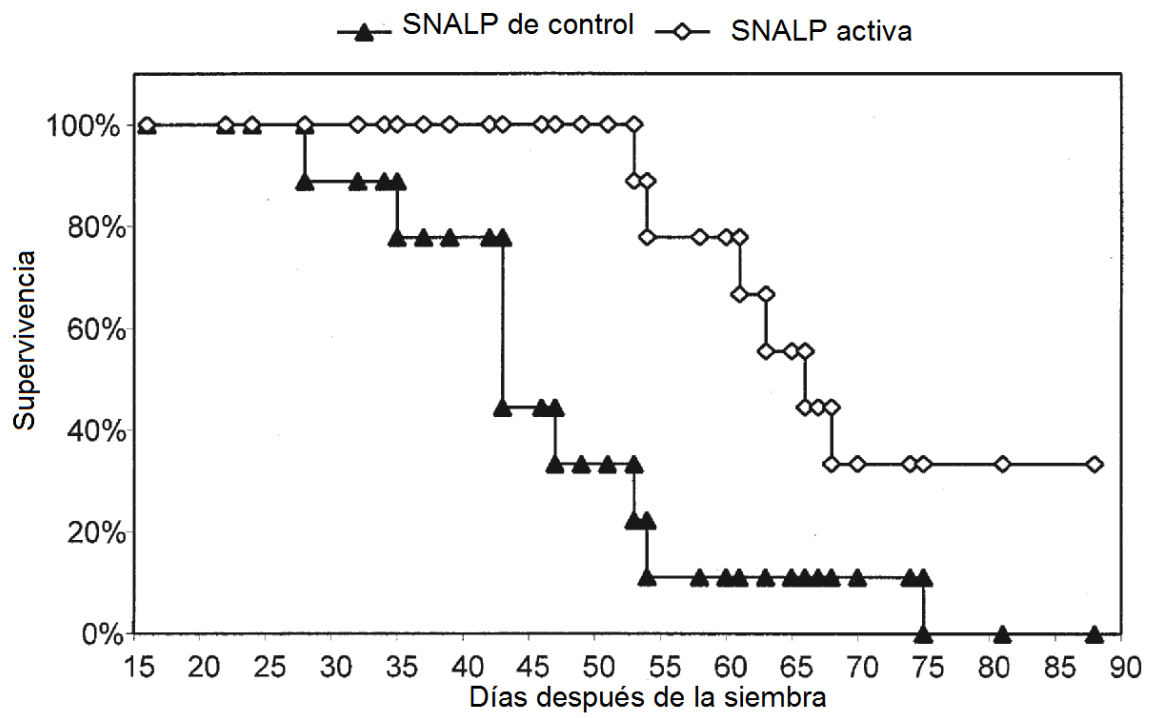


FIG. 14

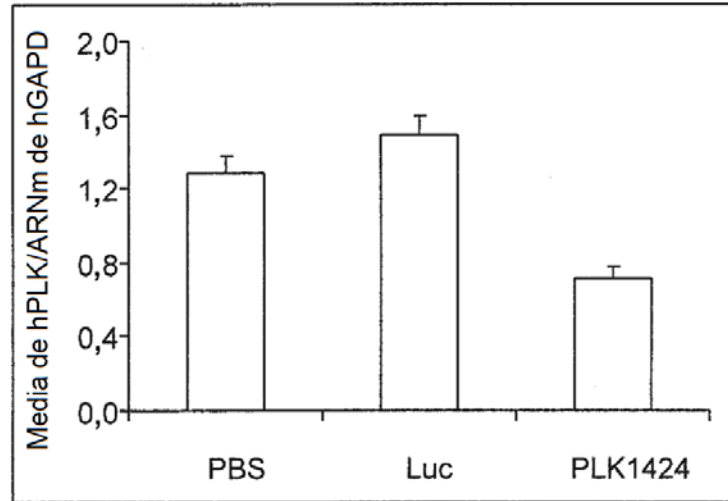


FIG. 15

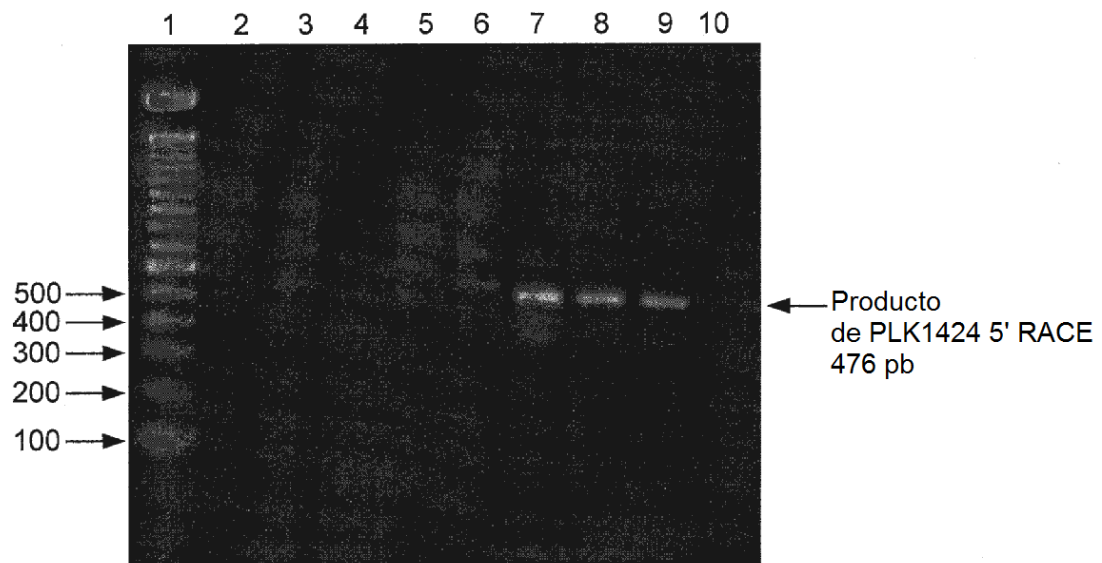
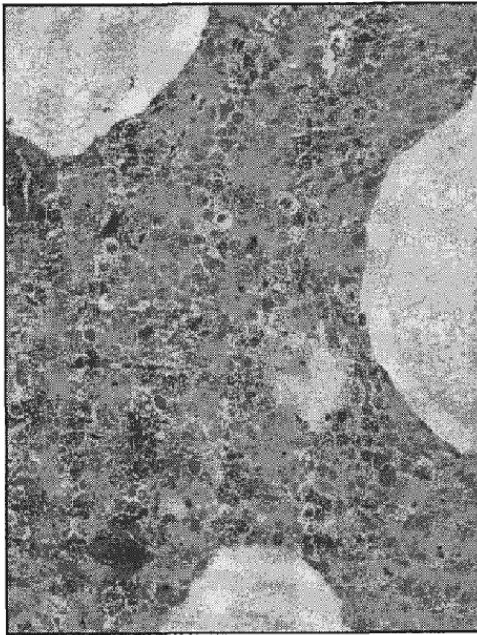
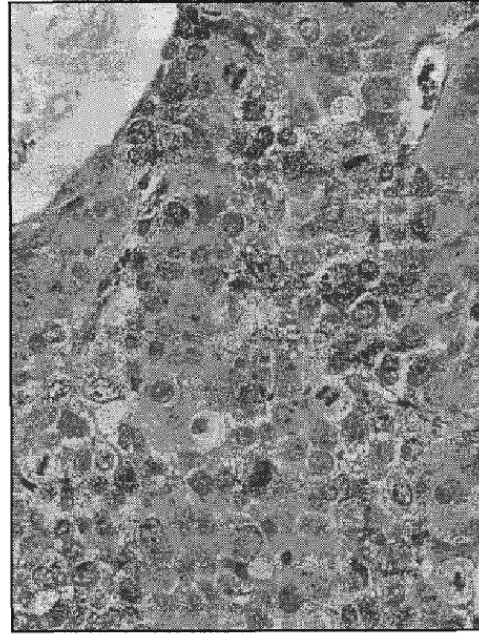


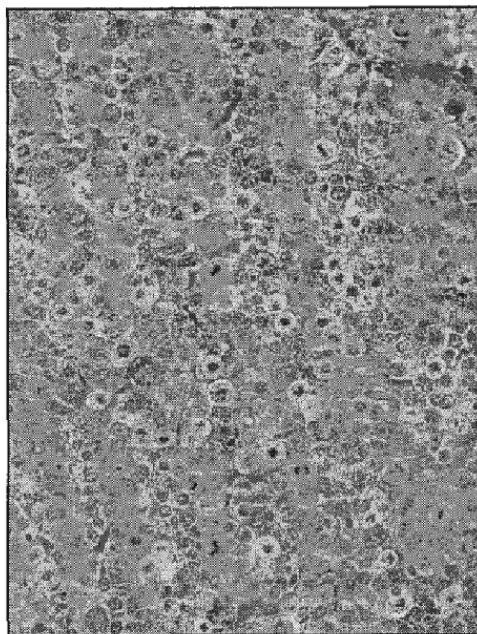
FIG. 16



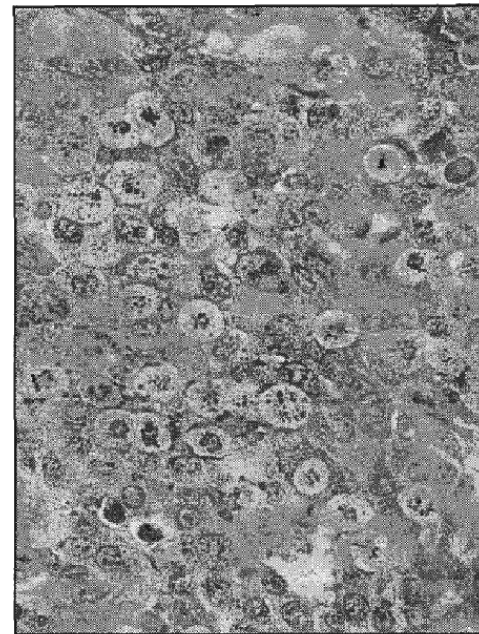
x200 mag



x400 mag

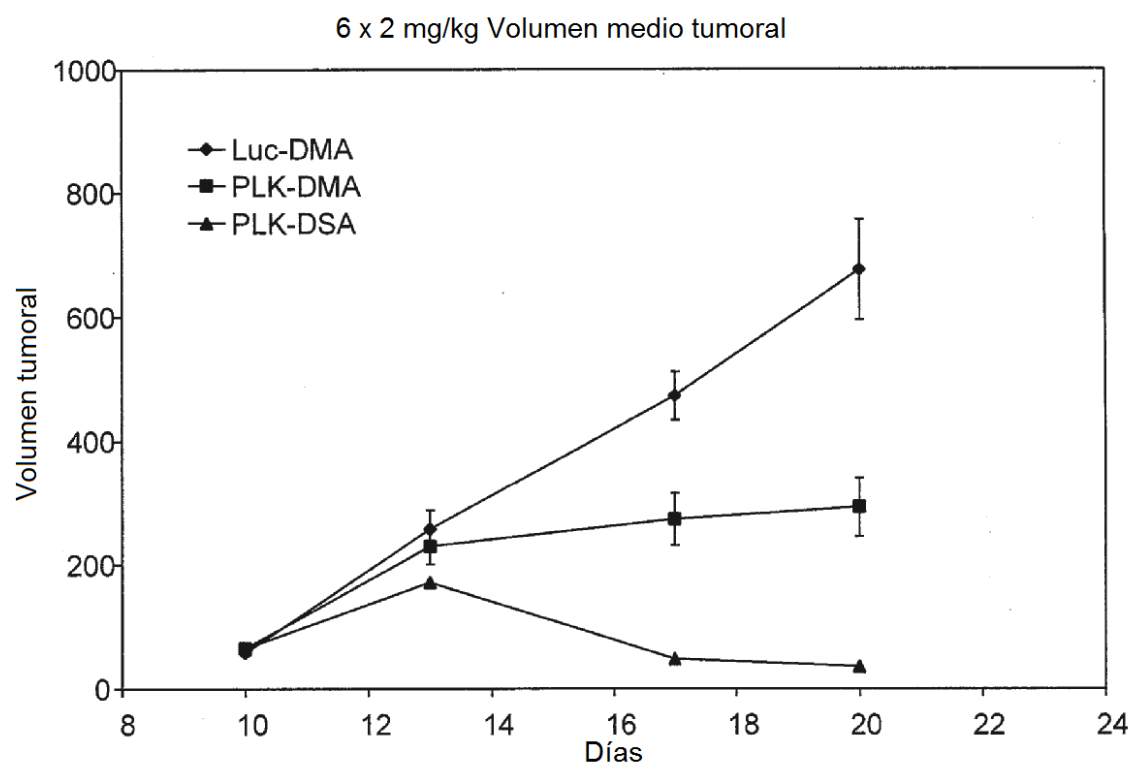


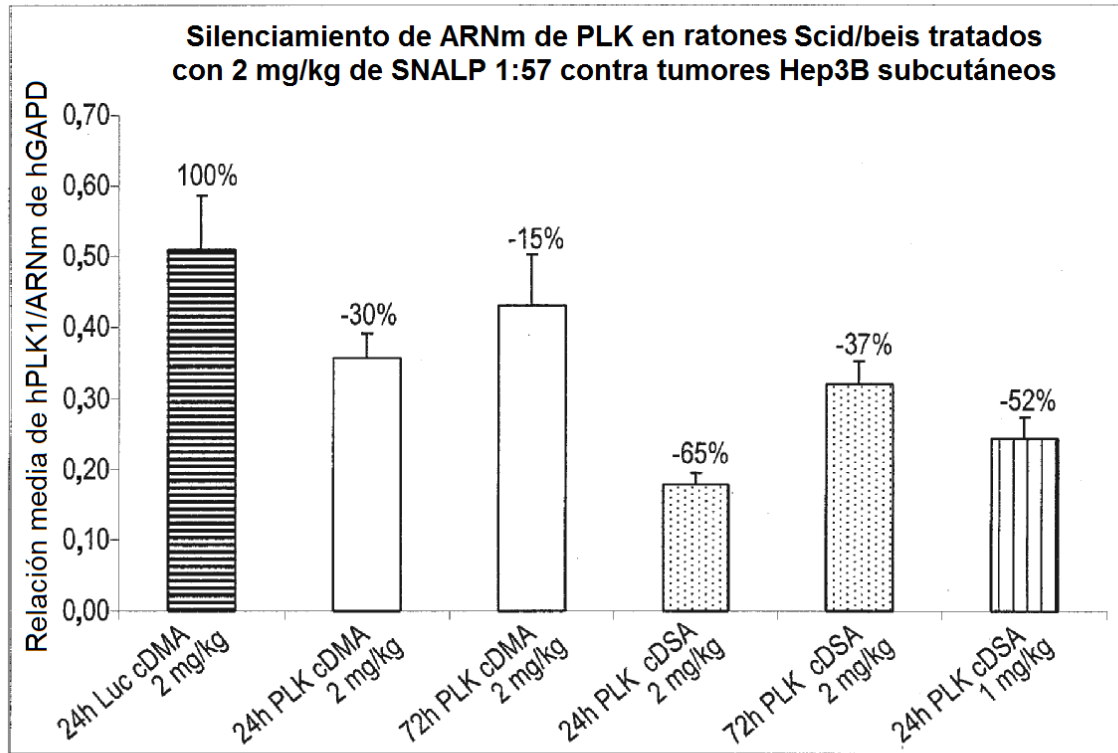
x200 mag



x400 mag

FIG. 17

**FIG. 18**

**FIG. 19**

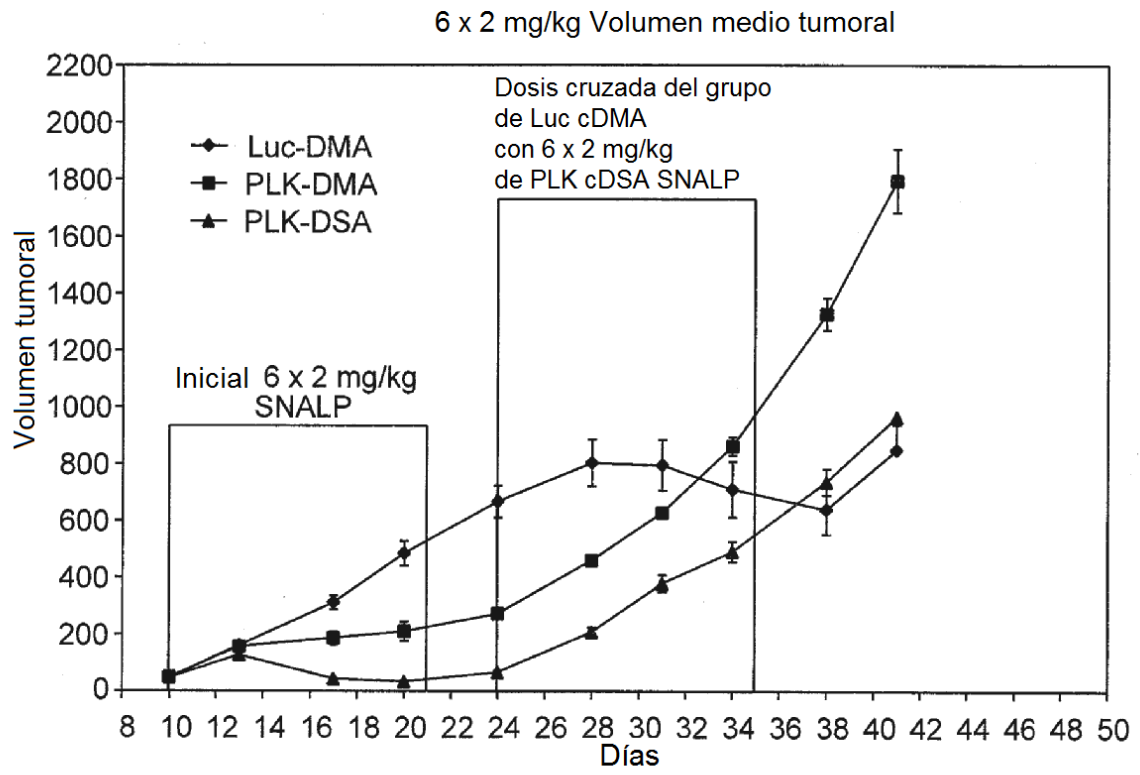


FIG. 20

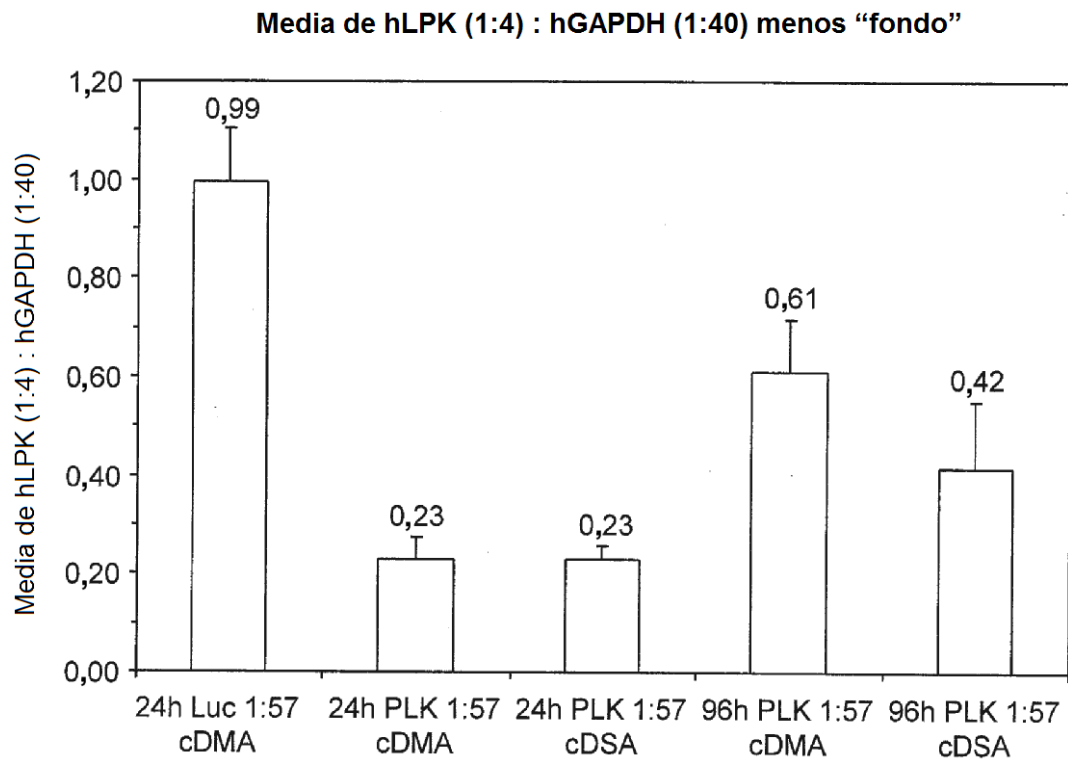
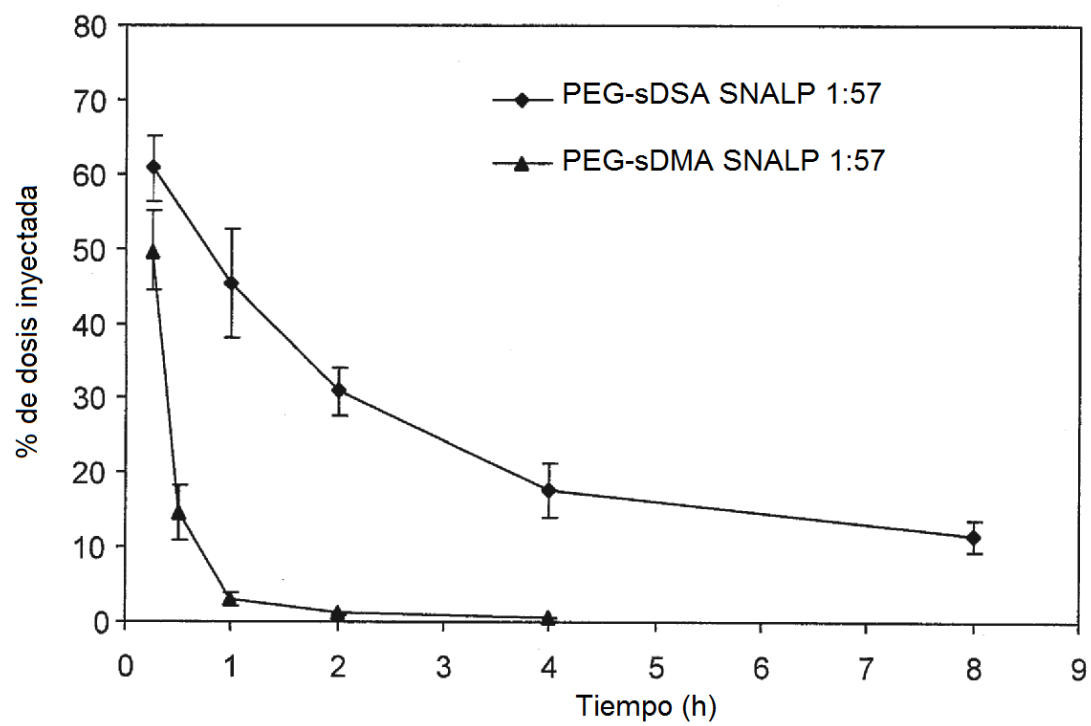


FIG. 21

**FIG. 22**