

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 168**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)
C07C 229/12 (2006.01)
A61K 31/221 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 47/14 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2010 PCT/US2010/038224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10144740**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2010 E 10786869 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.07.2018 EP 2440183**

54 Título: **Formulación lipídica mejorada**

30 Prioridad:

10.06.2009 US 185800 P
22.09.2009 US 244834 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2018

73 Titular/es:

ARBUTUS BIOPHARMA CORPORATION (100.0%)
100- 8900 Glenlyon Parkway
Burnaby, BC V5J 5J8, CA

72 Inventor/es:

AKINC, AKIN;
DORKIN, JOSEPH, R.;
QIN, XIAOJUN;
CANTLEY, WILLIAM;
MANOHARAN, MUTHIAH;
RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL, G.;
NARAYANANNAIR, JAYAPRAKASH, K.;
JAYARAMAN, MUTHUSAMY;
CHEN, JIANXIN y
ANSELL, STEVEN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones :

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

ES 2 689 168 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

Formulación lipídica mejorada

La presente invención está relacionada con el campo de la administración de agentes terapéuticos usando partículas lipídicas. En particular, la presente invención versa sobre un lípido catiónico específico, sobre usos del mismo en la administración de un agente terapéutico a una célula, y sobre formulaciones lipídicas que comprenden dicho lípido catiónico.

Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip), micro ARN (miARN), oligonucleótidos, ribozimas y plásmidos antisentido y ácidos nucleicos estimulantes del sistema inmunitario. Estos ácidos nucleicos actúan a través de diversos mecanismos. En el caso del ARNip o el miARN, estos ácidos nucleicos pueden regular a la baja los niveles intracelulares de proteínas específicas a través de un proceso denominado interferencia por ARN (iARN). Tras la introducción de ARNip o miARN en el citoplasma celular, estos constructos de ARN bicatenario pueden enlazarse a una proteína denominada RISC. La cadena sentido del ARNip o del miARN está desplazada con respecto al complejo RISC, proporcionando una plantilla dentro de RISC que puede reconocer ARNm, y enlazarse a él, con una secuencia complementaria a la del ARNip o miARN enlazado. Habiéndose enlazado al ARNm complementario, el complejo RISC escinde el ARNm y liberada las cadenas escindidas. La iARN puede proporcionar una regulación a la baja de las proteínas específicas seleccionando la destrucción específica del correspondiente ARNm que codifica la síntesis proteínica.

Las aplicaciones terapéuticas de la iARN son sumamente amplias, dado que los constructos de ARNip y miARN pueden ser sintetizados con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra una proteína diana. Hasta la fecha, los constructos de ARNip han mostrado la capacidad de regular a la baja específicamente proteínas diana en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, los constructos de ARNip están siendo evaluados actualmente en estudios clínicos.

Sin embargo, dos problemas que afrontan actualmente los constructos de ARNip o de miARN son, en primer lugar, su susceptibilidad de la digestión de las nucleasas en el plasma y, en segundo lugar, su limitada capacidad de lograr acceso al compartimento intracelular, en el que pueden enlazarse a RISC cuando son administrados sistémicamente como ARNip o miARN libres. Estos constructos bicatenarios pueden ser estabilizados mediante la incorporación de conectores nucleótidos químicamente modificados dentro de la molécula; por ejemplo, grupos fosfotioato. Sin embargo, estas modificaciones químicas proporcionan únicamente una protección limitada contra la digestión de las nucleasas y pueden disminuir la actividad del constructo. La administración intracelular de ARNip o miARN puede ser facilitada por el uso de sistemas de transporte tales como polímeros, liposomas catiónicos o por modificación química del constructo; por ejemplo, por la unión covalente de moléculas de colesterol. Sin embargo, se requieren sistemas mejorados de administración para aumentar la potencia de las moléculas de ARNip y miARN y reducir o eliminar el requisito de modificación química.

Los oligonucleótidos y las ribozimas antisentido también pueden inhibir la traducción de ARNm a proteína. En el caso de constructos antisentido, estos ácidos desoxinucleicos monocatenarios tienen una secuencia complementaria de la de la proteína diana ARNm y pueden enlazarse al ARNm por emparejamiento de bases de Watson-Crick. Este enlace evita la traducción del ARNm diana y/o desencadena la degradación por RNasa H de los transcritos de ARNm. En consecuencia, los oligonucleótidos antisentido tienen un tremendo potencial para la especificidad de acción (es decir, la regulación a la baja de una proteína específica relacionada con una enfermedad). Hasta la fecha, estos compuestos han resultado prometedores en varios modelos *in vitro* e *in vivo*, incluyendo modelos de enfermedad inflamatoria, cáncer y VIH (reseñado en Agrawal, *Trends in Biotech.* 14:376-387 (1996)). La falta de sentido también puede afectar a la actividad celular hibridándose específicamente con ADN cromosómico. Actualmente hay en curso evaluaciones clínicas avanzadas de varios fármacos antisentido en seres humanos. Las dianas de estos fármacos incluyen los genes bcl2 y de la apolipoproteína B y productos de ARNm.

Los ácidos nucleicos estimulantes del sistema inmunitario incluyen ácidos desoxirribonucleicos y ácidos ribonucleicos. En el caso de ácidos desoxirribonucleicos, se ha demostrado que ciertos motivos o secuencias provocan la estimulación inmunitaria en mamíferos. Estos motivos o secuencias incluyen el motivo CpG, secuencias ricas en pirimidina y secuencias palindrómicas. Se cree que el motivo CpG en ácidos desoxirribonucleicos es reconocido específicamente por un receptor endosomal, el receptor 9 de tipo Toll (TLR-9), el cual desencadena entonces el sistema de estimulación inmunitario tanto innato como adquirido. También han sido documentadas ciertas secuencias de ácido ribonucleico estimulantes del sistema inmunitario. Se cree que estas secuencias de ARN desencadenan la activación inmunitaria al enlazarse con los receptores 6 y 7 de tipo Toll (TLR-6 y TLR-7). Además, también está documentado que el ARN bicatenario es estimulante del sistema inmunitario, y se cree que se activa mediante el enlace con el TLR-3. Un problema muy conocido del uso de ácidos nucleicos terapéuticos está relacionado con la estabilidad del enlace fosfodiéster internucleótido y la susceptibilidad de este conector a las nucleasas. La presencia de exonucleasas y endonucleasas en el suero da lugar a la digestión rápida de ácidos nucleicos que poseen conectores fosfodiéster y, por ende, los ácidos nucleicos terapéuticos pueden tener una vida media muy corta en presencia de suero o dentro de las células (Zelphati, O., et al., *Antisense. Res. Dev.* 3:323-338 (1993); y Thierry, A.R., et al., pp. 147-161 en *Gene Regulation: Biology of Antisense RNA and DNA* (Ed. Erickson, RP e Izant, JG; Raven Press, Nueva York (1992)). Por estos y otros problemas conocidos, los ácidos nucleicos terapéuticos que están siendo desarrollados en la actualidad no emplean la química básica de fosfodiéster hallada en los ácidos nucleicos naturales.

Este problema ha sido superado parcialmente mediante modificaciones químicas que reducen la degradación por suero o intracelular. Se han ensayado modificaciones en el puente internucleótido fosfodiéster (usando, por ejemplo, enlaces de fosforotioato, metilfosfonato o fosforamidato), en la base de nucleótidos (por ejemplo, 5-propinil-pirimidinas), o en el azúcar (por ejemplo, azúcares modificados en 2') (Uhlmann E., et al. *Antisense: Chemical Modifications*. Encyclopedia of Cancer, Vol. X., pp. 64-81, Academic Press Inc. (1997)). Otros han intentado mejorar la estabilidad usando enlaces 2'-5' de azúcar (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 5.532.130). Se han intentado otros cambios. Sin embargo, ninguna de estas soluciones ha resultado enteradamente satisfactoria, e, *in vivo*, los ácidos nucleicos terapéuticos libres siguen teniendo únicamente una eficacia limitada.

Además, según se ha hecho notar más arriba en relación con el ARNip y el miARN, subsisten los problemas de la limitada capacidad de los ácidos nucleicos terapéuticos de atravesar las membranas celulares (véase, Vlassov, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1197:95-1082 (1994)) y los problemas asociados con la toxicidad sistémica, tales como la anafilaxis arbitrada por complementos, propiedades coagulatorias alteradas y la citopenia (Galbraith, et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.* 4:201-206 (1994)).

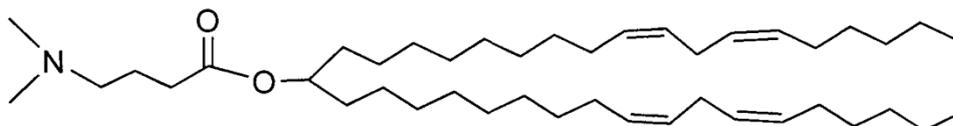
Para intentar mejorar la eficacia, los investigadores también han empleado sistemas de transporte a base de lípidos para administrar ácidos nucleicos terapéuticos modificados químicamente o no modificados. En Zelphati, O. y Szoka, F.C., *J. Contr. Rel.* 41:99-119 (1996), los autores se refieren al uso de liposomas aniónicos (convencionales), a liposomas sensibles al pH, a inmunoliposomas, a liposomas fusogénicos y a agregados de lípido catiónico/antisentido. De manera similar, se ha administrado ARNip sistémicamente en liposomas catiónicos, y se ha documentado que estas partículas de ácido nucleico y lípidos proporcionan una regulación mejorada a la baja de proteínas diana en mamíferos, incluyendo a los primates no humanos (Zimmermann et al., *Nature* 441: 111-114 (2006)).

En este contexto, el documento US 2009/0023673 A1 describe composiciones y métodos útiles en la administración de terapias, tales como liposomas y lipoplejos, a base de ácidos nucleicos. Además, el documento US 2003/0229037 A1 describe un anfífilo catiónico para facilitar el transporte de moléculas biológicamente activas a las células, comprendiendo dicho anfífilo un anclaje lipídico, un grupo espaciador y un grupo funcional.

A pesar del avance reciente, persiste la necesidad en la técnica de composiciones mejoradas de lípidos-ácidos nucleicos terapéuticos que sean adecuadas para un uso terapéutico general. Preferentemente, estas composiciones encapsularían los ácidos nucleicos con gran eficacia, tendrían proporciones elevadas fármaco:lípido, protegerían al ácido nucleico encapsulado contra la degradación y la eliminación en el suero, serían adecuados para la administración sistémica y permitirían la administración intracelular del ácido nucleico encapsulado. Además, estas partículas de lípidos-ácidos nucleicos deberían ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado, de modo que el tratamiento de pacientes con una dosis efectiva del ácido nucleico no esté asociado con una toxicidad significativa ni/o con riesgo para el paciente. La presente invención proporciona tales composiciones. Además, en la presente memoria se describen métodos de fabricación de las composiciones, y métodos de uso de las composiciones para introducir los ácidos nucleicos en las células, incluyendo para el tratamiento de enfermedades.

La presente invención versa sobre los siguientes elementos:

1. Un lípido catiónico de Fórmula I:



Fórmula I

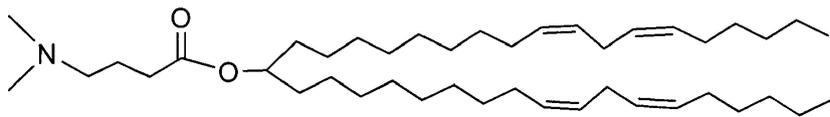
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. El lípido catiónico de la reivindicación 1 para ser usado en la administración de un agente terapéutico a una célula.
3. Una formulación lipídica que comprende un lípido catiónico de la reivindicación 1.
- 40 4. La formulación lipídica de la reivindicación 3 que, además, comprende un agente terapéutico, comprendiendo el agente terapéutico un ácido nucleico.
5. La formulación lipídica de la reivindicación 4 en la que el ácido nucleico se selecciona del grupo constituido por un ARNip, un microARN, un antagomir, un inhibidor de microARN, un ácido nucleico estimulante del sistema inmunitario o un adaptador U1.
- 45 6. La formulación lipídica de la reivindicación 3 comprende, además, al menos una apolipoproteína.
7. La formulación lipídica de la reivindicación 4 en la que el agente terapéutico es un antisentido, un ARNip o una ribozima.

La presente invención proporciona lípidos catiónicos novedosos, así como partículas lipídicas que los comprenden. Estas partículas lipídicas pueden comprender, además, un agente activo y ser usadas según métodos relacionados de la invención para administrar el agente activo a una célula.

5 El lípido de esta invención puede contener una o más formas isoméricas. Todas las formas isoméricas tales de este compuesto están expresamente incluidas en la presente invención. El compuesto de esta invención también puede contener enlaces (por ejemplo, enlaces carbono-carbono) o sustituyentes que puedan restringir la rotación del enlace; por ejemplo, la restricción resultante de la presencia de un doble enlace. En consecuencia, en la presente invención están expresamente incluidos todos los isómeros *cis/trans* y *E/Z*.

10 En un aspecto, la invención proporciona formulaciones lipídicas mejoradas que comprenden un lípido catiónico de Fórmula I, siendo la fórmula I:



La Fórmula I también puede ser denominada DLin-M-C3-DMA, MC3 o M-C3. Cada uno de la Fórmula I, DLin-M-C3-DMA, MC3 y M-C3 tiene la fórmula proporcionada inmediatamente arriba.

Normalmente, las formulaciones lipídicas también comprenden un lípido neutro, un esteroide y un PEG o un lípido modificado con PEG.

15 En un aspecto, la formulación lipídica mejorada también incluye un lípido de acceso (por ejemplo, un lípido que contenga GalNAc y/o folato).

En la presente memoria se describe la preparación, mediante un método de extrusión o de mezclado en línea, de las formulaciones lipídicas mejoradas.

20 En la presente memoria se describe un método de administración a un animal de las formulaciones lipídicas mejoradas que contienen un constructo a base de ARN, y de evaluación de la expresión del gen diana.

25 En un aspecto, puede usarse una formulación lipídica presentada en la invención, tal como una formulación lipídica que forma un complejo con un oligonucleótido, tal como un ARN bicatenario (ARNbc), para modificar (por ejemplo, disminuir) la expresión de un gen diana en una célula tumoral *in vivo* o *in vitro*. En algunas realizaciones, puede usarse una formulación lipídica presentada en la invención para modificar la expresión de un gen diana en una línea de células tumorales, incluyendo, sin limitación, las líneas celulares HeLa, HCT116, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2, Skov3, U87 y PC3.

30 En la presente memoria se describe una partícula lipídica que comprende el lípido de la presente invención. En ciertas realizaciones, la partícula lipídica comprende, además, un lípido neutro y un lípido capaz de reducir la agregación de partículas. En una realización, la partícula lipídica consiste esencialmente en (i) al menos un lípido de la presente invención; (ii) un lípido neutro seleccionado de DSPC, DPPC, POPC, DOPE y SM; (iii) esteroide, por ejemplo colesterol; y (iv) peg-lípido, por ejemplo PEG-DMG o PEG-cDMA, en una proporción molar de aproximadamente 20-60% de lípido catiónico: 5-25% de lípido neutro: 25-55% de esteroide; 0,5-15% de PEG-lípido. En una realización, el lípido de la presente invención es ópticamente puro.

35 En realizaciones relacionadas adicionales, en la presente memoria se describen partículas lipídicas que, además, comprenden un agente terapéutico. En una realización, el agente terapéutico es un ácido nucleico. En una realización, el ácido nucleico es un plásmido, un oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario, un oligonucleótido monocatenario —por ejemplo un oligonucleótido antisentido, un antagomir—, un oligonucleótido bicatenario —por ejemplo un ARNip—, un aptámero o una ribozima.

40 En otra realización relacionada adicional, en la presente memoria se describe una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica descrita en la presente memoria y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.

45 En la presente memoria se describe, en otras realizaciones relacionadas, un método de modulación de la expresión de un gen diana en una célula, comprendiendo el método la provisión a una célula de una partícula lipídica o de una composición farmacéutica descritas en la presente memoria. El gen diana puede ser un gen de la forma natural. En otra realización, el gen diana contiene una o más mutaciones. En una realización particular, el método comprende modular específicamente la expresión de un gen diana que contiene una o más mutaciones. En realizaciones particulares, la partícula lipídica comprende un agente terapéutico seleccionado de un oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario, un oligonucleótido monocatenario —por ejemplo un oligonucleótido antisentido, un antagomir—, un oligonucleótido bicatenario —por ejemplo un ARNip—, un aptámero, una ribozima. En una realización, el ácido nucleico es un plásmido que codifica un ARNip, un oligonucleótido antisentido, un aptámero o una ribozima.

En un aspecto, el gen diana se selecciona del grupo constituido por Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, el gen PDGF beta, el gen Erb-B, el gen Src, el gen CRK, el gen GRB2, el gen RAS, el gen MEKK, el gen JNK, el gen RAF, el gen Erk1/2, el gen PCNA(p21), el gen MYB, el gen JUN, el gen FOS, el gen BCL-2, el gen Ciclina D, el gen VEGF, el gen EGFR, el gen Ciclina A, el gen Ciclina E, el gen WNT-1, el gen beta-catenina, el gen c-MET, el gen PKC, el gen NFkB, el gen STAT3, el gen survivina, el gen Her2/Neu, el gen topoisomerasa I, el gen topoisomerasa II alfa, el gen p73, el gen p21(WAF1/CIP1), el gen p27(KIP1), el gen PPM1D, el gen RAS, el gen caveolina I, el gen MIB I, el gen MTAI, el gen M68, el gen SORT1, el gen XBP1, mutaciones en genes supresores tumorales, gen supresor tumoral p53 y combinaciones de los mismos.

En otra realización, el ácido nucleico es un plásmido que codifica un polipéptido o una variante o fragmento funcional del mismo, de modo que aumente la expresión del polipéptido o de la variante o fragmento funcional del mismo.

En otra realización relacionada adicional, en la presente memoria se describe un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizada por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende la provisión al sujeto de una partícula lipídica o composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en la que el agente terapéutico se selecciona de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y en la que el ARNip, el microARN o el ARN antisentido comprende un polinucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

En otra realización relacionada, en la presente memoria se describe un método de tratamiento de una enfermedad o trastorno caracterizada por la subexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende la provisión al sujeto de la composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en la que el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante o fragmento funcional del mismo.

En una realización adicional, en la presente memoria se describe un método de inducción de una respuesta inmunitaria en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en el que el agente terapéutico es un oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica es proporcionada al paciente en combinación con una vacuna o un antígeno.

En una realización relacionada, en la presente memoria se describe una vacuna que comprende la partícula lipídica descrita en la presente memoria y un antígeno asociado con una enfermedad o un patógeno. En una realización, la partícula lipídica comprende un ácido nucleico o un oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario. En una realización particular, el antígeno es un antígeno tumoral. En otra realización, el antígeno es un antígeno viral, un antígeno bacteriano o un antígeno parasitario.

En la presente memoria se describen, además, métodos de preparación de las partículas lipídicas y las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, así como juegos de reactivos útiles en la preparación de estas partículas lipídicas y de estas composiciones farmacéuticas.

En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método de evaluación de una composición que incluye un agente —por ejemplo, un agente terapéutico o un agente diagnóstico— y un lípido de la presente invención.

Las Figuras muestran:

La FIG. 1 es un gráfico de barras que representa el efecto de formulaciones lipídicas, incluyendo DLin-M-C3-DMA, en la inhibición del FVII en un modelo murino.

La FIG. 2 es un gráfico de barras que representa la respuesta a dosis de MC3 en ratas con diversas composiciones liposomales.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra la dependencia de la eficacia de la ApoE de formulaciones que comprenden MC3. Los ratones de la forma natural, pero no con ApoE inhibida, presentaron una reducción en los niveles de la proteína FVII dependiente de la dosis. La FIG. 2 también representa un gráfico que demuestra que la dependencia de la ApoE de la formulación liposomal de MC3 y la falta de silenciamiento en ratones con ApoE inhibida usando MC3 puede ser objeto de rescate eficaz mezclando de antemano con ApoE.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra los efectos de variaciones en el porcentaje molar de MC3 en una formulación liposomal y también los efectos de variaciones en el lípido neutro (cambiando, por ejemplo, el lípido neutro con DSPC, DMPC y DLPC).

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra que aumentar la protección con PEG disminuye el silenciamiento no arbitrado por GalNAc en ratones.

La FIG. 6 es un gráfico de barras que muestra que aumentar la protección con PEG disminuye el silenciamiento no arbitrado por GalNAc en ratas.

La FIG. 7 es un gráfico de barras que muestra la eficacia de formulaciones liposomales que tienen diferentes porcentajes molares de MC3, con y sin GalNAc.

La FIG. 8 es un gráfico de barras que muestra que la actividad de los liposomas diana de GalNAc es abolida en ratones con inhibición del receptor asialoglicoproteína (ASGPR).

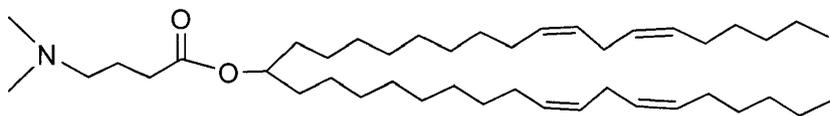
La FIG. 9 es una curva de respuesta a la dosis del FVII residual porcentual y de la dosis (mg/kg) para la formulación preparada en el Ejemplo 17.

5 La FIG. 10 es la curva de valoración del pK_a de un lípido catiónico de Fórmula I, determinada en el Ejemplo 18.

En la presente memoria se describe una formulación lipídica mejorada, que puede ser usada, por ejemplo, como administradora de un agente —por ejemplo, un agente a base de ácidos nucleicos, tal como un constructo a base de ARN— a una célula o a un sujeto. En la presente memoria también se describen métodos de administración de las formulaciones lipídicas mejoradas que contienen un constructo a base de ARN a un animal, y, en algunas realizaciones, de evaluación de la expresión del gen diana. En algunas realizaciones la formulación lipídica mejorada incluye un lípido de acceso (por ejemplo, un lípido de acceso descrito en la presente memoria, tal como un lípido que contenga GalNAc o folato).

Lípidos

15 En la presente memoria se describen formulaciones lipídicas mejoradas que comprenden un lípido catiónico de Fórmula I, un lípido neutro, un esteroles y un PEG o un lípido modificado con PEG, en las que la Fórmula I es



En una realización, el lípido es una mezcla racémica.

En una realización, el lípido está enriquecido en un diastereómero; por ejemplo el lípido tiene al menos 95%, al menos 90%, al menos 80% o al menos 70% de exceso diastereomérico.

En una realización, el lípido es quiralmente puro; es, por ejemplo, un único isómero.

20 En una realización, el lípido está enriquecido para un isómero.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria están inmovilizadas en al menos un 75%, al menos un 80% o al menos un 90%. En una realización, las formulaciones incluyen entre aproximadamente un 25% y aproximadamente un 75% molar de lípido catiónico de Fórmula I; por ejemplo, entre aproximadamente un 35 y aproximadamente un 65%, entre aproximadamente un 45 y aproximadamente un 65%, aproximadamente un 60%, aproximadamente un 57,5%, aproximadamente un 50% o aproximadamente un 40% molares.

25 En una realización, la formulación incluye entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 15% molar del lípido neutro; por ejemplo, entre aproximadamente un 3 y aproximadamente un 12%, entre aproximadamente un 5 y aproximadamente un 10%, o aproximadamente un 15%, aproximadamente un 10% o aproximadamente un 7,5% molares.

30 En una realización, la formulación incluye entre aproximadamente un 5% y aproximadamente un 50% molar del esteroles (por ejemplo, entre aproximadamente un 15 y aproximadamente un 45%, entre aproximadamente un 20 y aproximadamente un 40%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 38,5%, aproximadamente un 35% o aproximadamente un 31% molares. En una realización, el esteroles es colesterol.

35 En una realización, la formulación incluye entre aproximadamente un 0,5% y aproximadamente un 20% molar del PEG o del lípido modificado con PEG (por ejemplo, entre aproximadamente un 0,5 y aproximadamente un 10%, entre aproximadamente un 0,5 y aproximadamente un 5%, aproximadamente un 1,5%, aproximadamente un 0,5%, aproximadamente un 1,5%, aproximadamente un 3,5% o aproximadamente un 5% molares.

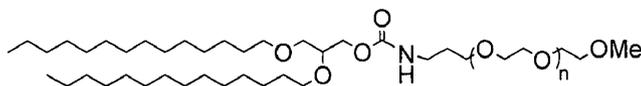
40 En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen un 25-75% de lípido catiónico de Fórmula I, un 0,5-15% del lípido neutro, un 5-50% del esteroles y un 0,5-20% molares del PEG o del lípido modificado con PEG.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen un 35-65% de lípido catiónico de Fórmula I, un 3-12% del lípido neutro, un 15-45% del esteroles y un 0,5-10% molares del PEG o del lípido modificado con PEG.

45 En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen un 45-65% de lípido catiónico de Fórmula I, un 5-10% del lípido neutro, un 25-40% del esteroles y un 0,5-10% molares del PEG o del lípido modificado con PEG.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 60% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 7,5% del lípido neutro, aproximadamente un 31% del esteroles y

aproximadamente un 1,5% molares del PEG o del lípido modificado con PEG. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol y el PEG-lípido es PEG-DMG (también denominado en la presente memoria PEG-C14 o C14-PEG). En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG comprende una molécula de PEG con un peso molecular medio de 2.000 Da. En otras realizaciones, el PEG o el lípido modificado con PEG comprende una molécula de PEG con un peso molecular medio de menos de 2.000 —por ejemplo, de aproximadamente 1.500 Da, aproximadamente 1.000 Da o aproximadamente 500 Da—. En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG es un compuesto de la siguiente Fórmula VI:



con una molécula de PEG con un peso molecular medio de 2.000 Da. En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG es PEG-glicerol diasteroílico (PEG-DSG, también denominado en la presente memoria PEG-C18 o C18-PEG).

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 50% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 10% del lípido neutro, aproximadamente un 38,5% del esteroles colesterol y aproximadamente un 1,5% molares del PEG o del lípido modificado con PEG. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol y el PEG-lípido es PEG-DMG (también denominado en la presente memoria PEG-C14 o C14-PEG). En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG es PEG-glicerol diestirilico (PEG-DSG, también denominado en la presente memoria PEG-C18 o C18-PEG). En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG es PEG-DPG (PEG-glicerol dipalmitoílico). En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG comprende una molécula de PEG con un peso molecular medio de 2.000 Da.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 50% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 10% del lípido neutro, aproximadamente un 35% del esteroles colesterol, aproximadamente un 4,5% del PEG o del lípido modificado con PEG y aproximadamente un 0,5% molares del lípido de acceso. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol, el PEG-lípido es PEG-glicerol diasteroílico (PEG-DSG, también denominado en la presente memoria PEG-C18 o C18-PEG), y el lípido de acceso es GalNAc3-PEG-DSG.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 50% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 10% del lípido neutro, aproximadamente un 35% del esteroles colesterol, aproximadamente un 4,5% del PEG o del lípido modificado con PEG y aproximadamente un 0,5% molares del lípido de acceso. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol, el PEG-lípido es PEG-DMG (también denominado en la presente memoria PEG-C14 o C14-PEG).

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 40% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 15% del lípido neutro, aproximadamente un 40% del esteroles colesterol y aproximadamente un 5% molares del PEG o del lípido modificado con PEG. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol, el PEG-lípido es PEG-DMG (también denominado en la presente memoria PEG-C14 o C14-PEG).

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 50% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 10% del lípido neutro, aproximadamente un 35% del esteroles colesterol y aproximadamente un 5% molares del PEG o del lípido modificado con PEG. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol, el PEG-lípido es PEG-DMG (también denominado en la presente memoria PEG-C14 o C14-PEG).

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 57,2% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 7,1% del lípido neutro, aproximadamente un 34,3% del esteroles colesterol y aproximadamente un 1,4% molares del PEG o del lípido modificado con PEG. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DPPC, el esteroles colesterol, el PEG-lípido es PEG-cDMA (el PEG-cDMA es presentado adicionalmente en Heyes et al. (*J. Controlled Release*, 107, 276-287 (2005))).

GalNAc3-PEG-DSG. En una realización, el PEG o el lípido modificado con PEG es un compuesto de Fórmula VI o PEG-DSG, en el que la molécula de PEG tiene un peso molecular medio de 2.000 Da.

En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen aproximadamente un 57,5% de lípido catiónico de Fórmula I, aproximadamente un 7,5% del lípido neutro, aproximadamente un 31,5% del esteroles colesterol y aproximadamente un 3,5% molares del PEG o del lípido modificado con PEG. En una realización preferente, el lípido catiónico es el compuesto de Fórmula I, el lípido neutro es DSPC, el esteroles colesterol y el PEG-lípido es PEG-DMG.

En una realización, la proporción lípido:ARNip es al menos aproximadamente 0,5:1, al menos aproximadamente 1:1, al menos aproximadamente 2:1, al menos aproximadamente 3:1, al menos aproximadamente 4:1, al menos aproximadamente 5:1, al menos aproximadamente 6:1, al menos aproximadamente 7:1, al menos aproximadamente 8:1, al menos aproximadamente 10:1, al menos aproximadamente 11:1, al menos aproximadamente 12:1, hasta al menos aproximadamente 15:1. En una realización, la proporción lípido:ARNip se encuentra entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 20:1, entre aproximadamente 3:1 y aproximadamente 15:1, entre aproximadamente 4:1 y aproximadamente 15:1, entre aproximadamente 5:1 y aproximadamente 13:1. En una realización, la proporción lípido:ARNip se encuentra entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 15:1.

En un aspecto, la formulación lipídica mejorada también incluye un lípido de acceso. En algunas realizaciones, el lípido de acceso incluye un resto de GalNAc (es decir, un resto de N-galactosamina). Por ejemplo, un lípido de acceso que incluye un resto de GalNAc puede incluir los divulgados en el documento USSN 12/328.669, presentado el 4/12/2008. Un lípido de acceso también puede incluir cualquier otro lípido (por ejemplo, un lípido de acceso) conocido en la técnica, según se describe, por ejemplo, en el documento USSN 12/328.669, o en la Publicación Internacional nº WO 2008/042973. En algunas realizaciones, el lípido de acceso incluye varios restos de GalNAc; por ejemplo, dos o tres restos de GalNAc. En algunas realizaciones, el lípido de acceso contiene varios restos —por ejemplo, dos o tres— de N-acetilgalactosamina (GalNAc). En algunas realizaciones, el lípido en el lípido de acceso es 1,2-di-O-hexadecil-*sn*-glicérido (es decir, DSG). En algunas realizaciones, el lípido de acceso incluye un resto de PEG (por ejemplo, un resto de PEG que tenga un peso molecular de al menos aproximadamente 500 Da, tal como aproximadamente 1000 Da, 1500 Da, 2000 Da o mayor); por ejemplo, el resto de acceso está conectado al lípido a través de un resto de PEG.

En algunas realizaciones, el lípido de acceso incluye un resto de folato. Por ejemplo, un lípido de acceso que incluye un resto de folato puede incluir los divulgados en el documento USSN 12/328.669, presentado el 4/12/2008. En otra realización, un lípido de acceso que incluye un resto de folato puede incluir el compuesto de Fórmula V.

La siguiente Fórmula L representa lípidos de acceso ejemplares:

(Grupo de acceso)_n-L-lípido

Fórmula L

en la que:

grupo de acceso es cualquier grupo de acceso conocido a un experto en la técnica y/o descrito en la presente memoria (por ejemplo, un receptor de la superficie celular);

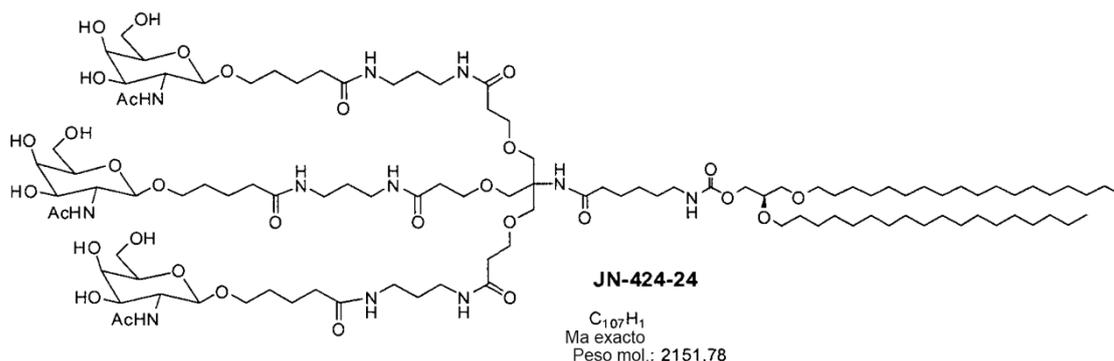
n es un número entero entre 1 y 5, (por ejemplo, 3);

L es un grupo conector; y

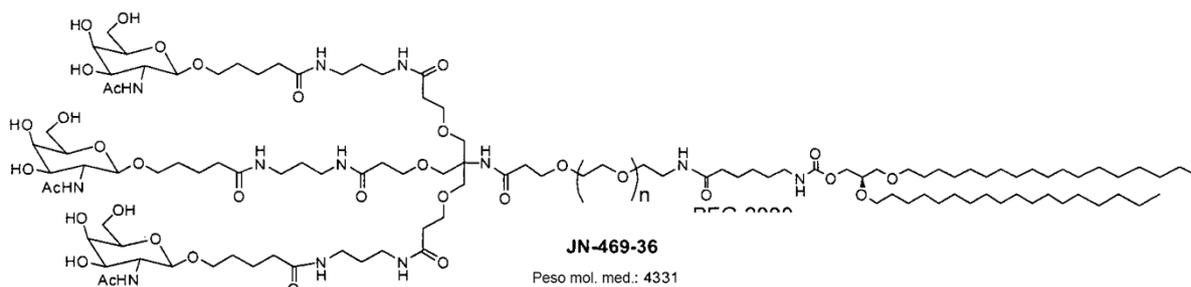
lípido es un lípido tal como un lípido descrito en la presente memoria (por ejemplo, un lípido neutro, tal como DSG).

En algunas realizaciones, el grupo conector incluye un resto de PEG.

En algunas realizaciones, el lípido de acceso es un compuesto II, III, IV o V proporcionado a continuación:

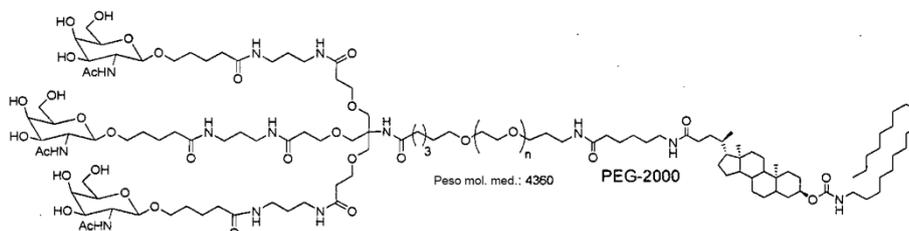


Fórmula II
GalNAc3-DSG



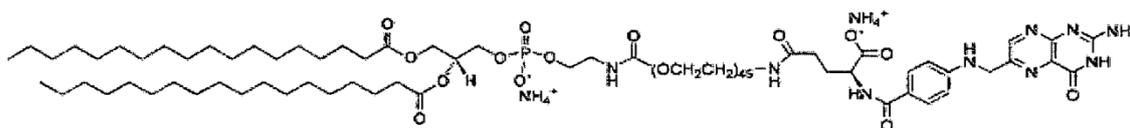
Fórmula III

GalNAc3-PEG-DSG



(GalNAc)₃-PEG-LCO

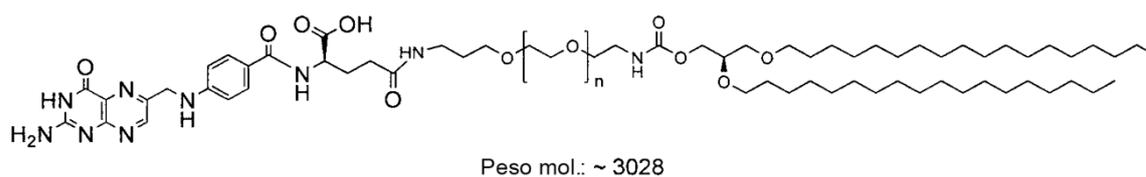
Fórmula IV



Folato-PEG-DSPE

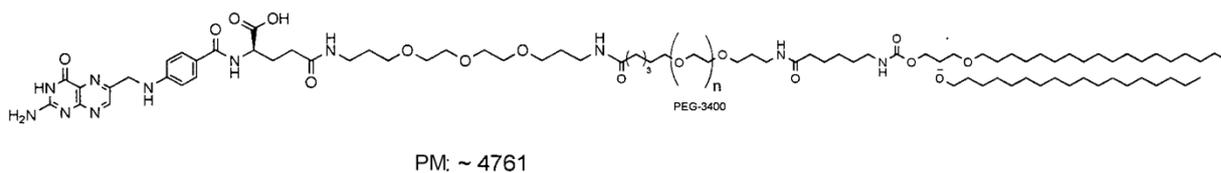
1,2-diesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[folato(polietilenglicol)-2000] (sal amónica)

Fórmula V



Folato-PEG2000-DSG

Fórmula VI



Folato-PEG3400-DSG

Fórmula VII

5 En algunas realizaciones, el lípido de acceso está presente en la formulación en una cantidad entre aproximadamente un 0,001% y aproximadamente un 5% molares (por ejemplo, aproximadamente un 0,005%, 0,15%, 0,3%, 0,5%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 4% o 5%). En algunas realizaciones, el lípido de acceso está presente en la formulación en una cantidad entre aproximadamente un 0,005% y aproximadamente un 1,5%. En algunas realizaciones, el lípido de acceso está incluido en una formulación descrita en la presente memoria.

5 En algunas realizaciones, la formulación lipídica también incluye un antioxidante (por ejemplo, un neutralizador de radicales). El antioxidante puede estar presente en la formulación, por ejemplo, en una cantidad entre aproximadamente un 0,01% y aproximadamente un 5%. El antioxidante puede ser hidrófobo o hidrófilo (por ejemplo, soluble en lípidos o soluble en agua). En algunas realizaciones, el antioxidante es un compuesto fenólico, por ejemplo, butilhidroxitolueno, resveratrol, coenzima Q10, u otros flavonoides, o una vitamina, por ejemplo, vitamina E o vitamina C. Otros antioxidantes ejemplares incluyen el ácido lipoico, el ácido úrico, un caroteno tal como beta-caroteno o retinol (vitamina A), glutatión, melatonina, selenio y ubiquinol.

En algunas realizaciones, el receptor para el lípido de acceso (por ejemplo, un lípido que contenga GalNAc) es el receptor asialoglicoproteína (es decir, ASGPR).

10 En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria son producidas mediante un método de extrusión o un método de mezclado en línea.

15 El método de extrusión (también denominado método de preformación o procedimiento por lotes) es un método en el que se preparan en primer lugar los liposomas vacíos (es decir, sin ácido nucleico alguno), seguido por la adición de ácido nucleico al liposoma vacío. La extrusión de composiciones liposomales a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o de una membrana cerámica asimétrica da como resultado una distribución de tamaños relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión es sometida a un ciclo a través de la membrana una o más veces hasta que se logre la distribución deseada de tamaños del complejo liposomal. Los liposomas pueden ser extrudidos a través de membranas con poros sucesivamente menores para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas. En algunos casos, las composiciones de lípido-ácido nucleico que se forman pueden ser usadas sin dimensionamiento alguno. Estos métodos son dados a conocer en los documentos US 5.008.050; US 4.927.637; US 4.737.323; *Biochim Biophys Acta*. 19 de octubre de 1979, 557(1):9-23; *Biochim Biophys Acta*. 2 de octubre de 1980, 601(3):559-7; *Biochim Biophys Acta*. 13 de junio de 1986, 858(1):161-8; y *Biochim. Biophys. Acta* 1985 812, 55-65.

25 El método de mezclado en línea es un método en el que tanto los lípidos como el ácido nucleico son añadidos en paralelo a una cámara de mezclado. La cámara de mezclado puede ser un simple conector en T o cualquier otra cámara de mezclado que resulte conocida para un experto en la técnica. Estos métodos son divulgados en las patentes estadounidenses nºs 6.534.018 y US 6.855.277; en la publicación estadounidense 2007/0042031 y en *Pharmaceuticals Research*, Vol. 22, nº 3, marzo de 2005, pp. 362-372.

30 Se entiende, además, que las formulaciones descritas en la presente memoria pueden ser preparadas por cualquier método conocido para una persona con un dominio normal de la técnica.

En una realización adicional, se definen en la Tabla 1 formulaciones representativas que comprenden el compuesto de Fórmula I.

Tabla 1

MC3	DSPC	Colesterol	PEG
60	7,5	31	1,5
50	10	38,5	1,5
40	20	38,5	1,5
50	10	38,5	1,5
50	10	38,5	1,5
40	20	38,5	1,5
60	7,5	21	1,5
50	10	38,5	1,5
50	10	38,5	1,5
40	20 (DMPC)	38,5	1,5
30	30	38,5	1,5
50	10 (DMPC)	38,5	1,5
30	30 (DMPC)	38,5	1,5
51	10 (DLPC)	38,5	1,5
40	20 (DLPC)	38,5	1,5

MC3	DSPC	Colesterol	PEG
40	20	38,5	1,5
40	10	40	10
60	10	20	10
40	20	37	3
60	10	27	3

En una realización, se describen como sigue formulaciones específicas que comprenden el compuesto de Fórmula I:

Proporción de lípidos (en porcentaje molar)

Proporción lípido:ARNip

- 5 50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DMG)
Lípido:ARNip ~ 11
 - 40/15/40/5 (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DMG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 50/10/35/4,5/0,5% (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DSG (C18-PEG): GalNAc3-PEG-DSG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 10 50/10/30/9,5/0,5% (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DSG: GalNAc3-PEG-DSG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 50/10/35/5% (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DSG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 15 50/10/38,5/1,5 (MC3 : DPPC : Colesterol : PEG-DMG)
Lípido:ARNip ~ 11
 - 40/15/40/5 (MC3 : DPPC : Colesterol: PEG-DMG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 50/10/35/4,5/0,5% (MC3 : DPPC : Colesterol : PEG-DSG: GalNAc3-PEG-DSG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 20 50/10/30/9,5/0,5% (MC3 : DPPC : Colesterol : PEG-DSG: GalNAc3-PEG-DSG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 50/10/35/5% (MC3 : DPPC : Colesterol : PEG-DSG)
Proporción lípido:ARNip ~ 11
 - 25 50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DMG)
Lípido:ARNip ~ 7
 - 50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DSG)
Lípido:ARNip ~ 10
 - 50/10/38,5/1,5 (MC3 : DSPC : Colesterol: PEG-DMG)
Lípido:ARNip ~ 12
 - 30 50/10/35/5% (MC3 : DSPC : Colesterol : PEG-DMG)
Proporción lípido:ARNip ~ 8
 - 50/10/35/5% (MC3 : DSPC : Colesterol: PEG-DMG)
Proporción lípido:ARNip ~ 10
 - 35 En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria están inmovilizadas en al menos un 75%, al menos un 80% o al menos un 90%.
- En una realización, las formulaciones descritas en la presente memoria comprenden, además, una apolipoproteína. Según se usa en la presente memoria, el término “apolipoproteína” o “lipoproteína” se refiere a apolipoproteínas conocidas para los expertos en la técnica y a variantes y fragmentos de las mismas, y a agonistas de apolipoproteínas, a análogos o fragmentos de los mismos descritos a continuación.

Apolipoproteínas adecuadas incluyen, sin limitación, ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoA-V y ApoE, y formas polimórficas activas, isoformas, variantes y mutantes, así como fragmentos o formas truncadas de las mismas. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína es una apolipoproteína que contiene tiol. "Apolipoproteína que contiene tiol" se refiere a una apolipoproteína, variante, fragmento o isoforma que contiene al menos un residuo de cisteína. Las apolipoproteínas más comunes que contienen tiol son ApoA-I Milán (ApoA-I_M) y ApoA-I París (ApoA-I_P), que contienen un residuo de cisteína (Jia et al., 2002, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 297: 206-13; Bielicki y Oda, 2002, *Biochemistry* 41: 2089-96). ApoA-II, ApoE2 y ApoE3 también son apolipoproteínas que contienen tiol. Las patentes estadounidenses n^{os} 5.672.685; 5.525.472; 5.473.039; 5.182.364; 5.177.189; 5.168.045; 5.116.739 describen la ApoE aislada y/o fragmentos activos y análogos polipeptídicos de la misma, incluyendo formas de la misma producidas de manera recombinante. La ApoE3 es dada a conocer en Weisgraber, et al., "Human E apoprotein heterogeneity: cysteine-arginine interchanges in the amino acid sequence of the apo-E isoforms", *J. Biol. Chem.* (1981) 256: 9077-9083; y Rall, et al., "Structural basis for receptor binding heterogeneity of apolipoprotein E from type III hyperlipoproteinemic subjects", *Proc. Nat. Acad. Sci.* (1982) 79: 4696-4700. Véase también el número de entrada K00396 a GenBank.

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede estar en su forma madura, en su forma de preproapolipoproteína o en su forma de proapolipoproteína. También pueden utilizarse homo y heterodímeros (cuando sea viable) de pro-ApoA-I y ApoA-I madura (Duverger et al., 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(12):1424-29), ApoA-I Milán (Klon et al., 2000, *Biophys. J.* 79:(3)1679-87; Franceschini et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260: 1632-35), ApoA-I París (Daum et al., 1999, *J. Mol. Med.* 77:614-22), ApoA-II (Shelness et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(14):8637-46; Shelness et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(15):9929-35), ApoA-IV (Duverger et al., 1991, *Euro. J. Biochem.* 201(2):373-83) y ApoE (McLean et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258(14):8993-9000).

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser un fragmento, variante o isoforma de la apolipoproteína. La término "fragmento" se refiere a cualquier apolipoproteína que tenga una secuencia de aminoácidos más corta que la de una apolipoproteína nativa, reteniendo dicho fragmento la actividad de la apolipoproteína nativa, incluyendo las propiedades de enlace lipídico. Con "variante" se quiere decir sustituciones o alteraciones en las secuencias de aminoácidos de la apolipoproteína, sustituciones o alteraciones —por ejemplo, adiciones y deleciones de residuos de aminoácidos— que no abolen la actividad de la apolipoproteína nativa, incluyendo las propiedades de enlace lipídico. Así, una variante puede comprender una proteína o péptido que tenga una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la de una apolipoproteína nativa proporcionada en la presente memoria en la que uno o más residuos de aminoácidos han sido sustituidos de forma conservadora con aminoácidos químicamente similares. Ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de al menos un residuo hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro. Asimismo, por ejemplo, se contempla la sustitución de al menos un residuo hidrófilo, tal como, por ejemplo, entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, y entre glicina y serina (véanse las patentes estadounidenses n^{os} 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166). El término "isoforma" se refiere a una proteína que tiene una función igual, mayor o parcial y una secuencia similar, idéntica o parcial, y puede o no ser producto del mismo gen y habitualmente específico a un tejido (véanse Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson y Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz y Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sacre et al., 2003, *FEBS Lett.* 540(1-3):181-7; Weers, et al., 2003, *Biophys. Chem.* 100(1-3):481-92; Gong et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277(33):29919-26; Ohta et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(23):14888-93 y la patente estadounidense n^o 6.372.886).

En ciertas realizaciones, los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria incluyen el uso de una construcción quimérica de una apolipoproteína. Por ejemplo, una construcción quimérica de una apolipoproteína puede estar comprendida por un dominio apolipoproteínico con alta capacidad de enlace lipídico asociado con un dominio apolipoproteínico que contenga propiedades protectoras de reperusión contra la isquemia. Una construcción quimérica de una apolipoproteína puede ser una construcción que incluya regiones separadas dentro de una apolipoproteína (es decir, construcción homóloga), o una construcción quimérica puede ser una construcción que incluya regiones separadas entre apolipoproteínas diferentes (es decir, construcciones heterólogas). Las composiciones que comprenden una construcción quimérica también pueden incluir segmentos que sean variantes o segmentos de apolipoproteína diseñados para tener un carácter específico (por ejemplo, una propiedad de enlace con lípidos, enlace a receptores, enzimática, activación enzimática, antioxidante o reducción-oxidación) (véanse Weisgraber 1990, *J. Lipid Res.* 31(8):1503-11; Hixson y Powers 1991, *J. Lipid Res.* 32(9):1529-35; Lackner et al., 1985, *J. Biol. Chem.* 260(2):703-6; Hoeg et al., 1986, *J. Biol. Chem.* 261(9):3911-4; Gordon et al., 1984, *J. Biol. Chem.* 259(1):468-74; Powell et al., 1987, *Cell* 50(6):831-40; Aviram et al., 1998, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18(10):1617-24; Aviram et al., 1998, *J. Clin. Invest.* 101(8):1581-90; Billecke et al., 2000, *Drug Metab. Dispos.* 28(11):1335-42; Draganov et al., 2000, *J. Biol. Chem.* 275(43):33435-42; Steinmetz y Utermann 1985, *J. Biol. Chem.* 260(4):2258-64; Widler et al., 1980, *J. Biol. Chem.* 255(21):10464-71; Dyer et al., 1995, *J. Lipid Res.* 36(1):80-8; Sorenson et al., 1999, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19(9):2214-25; Palgunachari 1996, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16(2):328-38; Thurberg et al., *J. Biol. Chem.* 271(11):6062-70; Dyer 1991, *J. Biol. Chem.* 266(23):150009-15; Hill 1998, *J. Biol. Chem.* 273(47):30979-84).

Las apolipoproteínas utilizadas en la presente memoria también incluyen apolipoproteínas recombinantes, sintéticas, semisintéticas o purificadas. En la técnica se conocen bien métodos para obtener apolipoproteínas —o equivalentes de las mismas— utilizadas en la presente memoria. Por ejemplo, las apolipoproteínas pueden ser separadas del plasma o productos naturales, por ejemplo, mediante centrifugación en gradiente de densidad o cromatografía de inmunoafinidad, o producidas de manera sintética, semisintética o usando técnicas de ADN recombinante conocidas para los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Mulugeta et al., 1998, *J. Chromatogr.* 798(1-2): 83-90; Chung et al., 1980, *J. Lipid Res.* 21(3):284-91; Cheung et al., 1987, *J. Lipid Res.* 28(8):913-29; Persson, et al., 1998, *J. Chromatogr.* 711:97-109; las patentes estadounidenses n^{os} 5.059.528, 5.834.596, 5.876.968 y 5.721.114; y las publicaciones PCT WO 86/04920 y WO 87/02062).

Las apolipoproteínas utilizadas en la presente memoria incluyen, además, agonistas apolipoproteínicos tales como péptidos y análogos de péptidos que imitan la actividad de ApoA-I, ApoA-I Milán (ApoA-I_M), ApoA-I París (ApoA-I_P), ApoA-II, ApoA-IV y ApoE. Por ejemplo, la apolipoproteína puede ser cualquiera de las descritas en las patentes estadounidenses n^{os} 6.004.925, 6.037.323, 6.046.166 y 5.840.688.

Los péptidos o análogos de péptidos agonistas de apolipoproteínas pueden ser sintetizados o fabricados usando cualquier técnica de síntesis de péptidos conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, las técnicas descritas en las patentes estadounidenses n^{os} 6.004.925, 6.037.323 y 6.046.166. Por ejemplo, los péptidos pueden ser preparados usando la técnica sintética en fase sólida inicialmente descrita por Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Pueden encontrarse otras técnicas de síntesis de péptidos en Bodanszky et al., *Peptide Synthesis*, John Wiley & Sons, 2^a ed., (1976) y otras referencias fácilmente disponibles para los expertos en la técnica. Puede encontrarse un resumen de técnicas de síntesis de polipéptidos en Stuart y Young, *Solid Phase Peptide. Synthesis*, Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois (1984). Los péptidos también pueden ser sintetizados por métodos de solución descritos en *The Proteins*, Vol. II, 3^a ed., Neurath et. al., ed., p. 105-237, Academic Press, Nueva York, Nueva York (1976). En los textos anteriormente mencionados, así como en McOmie, *Protective Groups in Organic Chemistry*, Plenum Press, Nueva York, Nueva York (1973), se describen grupos protectores apropiados para ser usados en síntesis de diferentes péptidos. Los péptidos descritos en la presente memoria también podrían prepararse mediante escisión química o enzimática a partir de porciones mayores de, por ejemplo, apolipoproteína A-I.

En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser una mezcla de apolipoproteínas. En una realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla homogénea; es decir, un único tipo de apolipoproteína. En otra realización, la apolipoproteína puede ser una mezcla heterogénea de apolipoproteínas; es decir, una mezcla de dos o más apolipoproteínas diferentes. Las realizaciones de mezclas heterogéneas de apolipoproteínas pueden comprender, por ejemplo, una mezcla de una apolipoproteína de una fuente animal y una apolipoproteína de una fuente semisintética. En ciertas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I y ApoA-I Milán. En ciertas realizaciones, una mezcla heterogénea puede comprender, por ejemplo, una mezcla de ApoA-I Milán y ApoA-I París. Las mezclas adecuadas para ser usadas en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria resultarán evidentes para un experto en la técnica.

Si la apolipoproteína es obtenida de fuentes naturales, puede ser obtenida de una fuente vegetal o animal. Si la apolipoproteína es obtenida de una fuente animal, la apolipoproteína puede ser de cualquier especie. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser obtenida de una fuente animal. En ciertas realizaciones, la apolipoproteína puede ser obtenida de una fuente humana. En realizaciones preferentes, la apolipoproteína se deriva de la misma especie que el individuo al que se administra la apolipoproteína.

En una realización, el gen diana es seleccionado del grupo constituido por el Factor VII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, el gen PDGF beta, el gen Erb-B, el gen Src, el gen CRK, el gen GRB2, el gen RAS, el gen MEKK, el gen JNK, el gen RAF, el gen Erk1/2, el gen PCNA(p21), el gen MYB, el gen JUN, el gen FOS, el gen BCL-2, el gen Ciclina D, el gen VEGF, el gen EGFR, el gen Ciclina A, el gen Ciclina E, el gen WNT-1, el gen beta-catenina, el gen c-MET, el gen PKC, el gen NFkB, el gen STAT3, el gen survivina, el gen Her2/Neu, el gen topoisomerasa I, el gen topoisomerasa II alfa, el gen p73, el gen p21(WAF1/CIP1), el gen p27(KIP1), el gen PPM1D, el gen RAS, el gen caveolina I, el gen MIB I, el gen MTAI, el gen M68, mutaciones en genes supresores tumorales, gen supresor tumoral p53 y combinaciones de los mismos. En una realización, el gen diana es un gen expresado en el hígado; por ejemplo, el gen del Factor VII (FVII). El efecto de la expresión del gen diana —por ejemplo, FVII— es evaluado midiendo los niveles de FVII en una muestra biológica, tal como una muestra de suero o de tejido. Se puede determinar el nivel de FVII en la sangre, por ejemplo, medido, por ejemplo, mediante ensayo de actividad de FVII. En una realización, se puede evaluar el nivel de ARNm en el hígado. En otra realización preferente, se efectúan al menos dos tipos de evaluación; por ejemplo, se realizan tanto una evaluación del nivel proteínico (por ejemplo, en la sangre) como una medición del nivel de ARNm (por ejemplo, en el hígado).

En una realización, el agente es un ácido nucleico, tal como un ARN bicatenario (ARNbc).

En otra realización, el agente de ácido nucleico es ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario, o un híbrido de ADN-ARN. Por ejemplo, un ADN bicatenario puede ser un gen estructural, un gen que incluya regiones de control y terminación o un sistema autorreplicante, tal como ADN viral o plasmídico. Un ARN bicatenario puede ser, por ejemplo, un ARNbc u otro reactivo de interferencia por ARN. Un ácido nucleico monocatenario puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un microARN, o un oligonucleótido formador de tripletes.

- En otra realización adicional, en diversos momentos después de la administración de un agente candidato, se toma del sujeto de ensayo una muestra biológica, tal como una muestra de fluido —por ejemplo, sangre, plasma o suero— o una muestra tisular —tal como una muestra hepática— y se la somete a ensayo en busca del efecto del agente sobre la proteína diana o de los niveles de expresión de ARNm. En una realización particularmente preferente, el agente candidato es un ARNbc que tiene como diana al FVII, y la muestra biológica es sometida a ensayo en busca del efecto sobre la proteína Factor VII o los niveles de ARNm. En una realización, se evalúan los niveles plasmáticos de la proteína FVII, tal como mediante el uso de un ensayo de inmunohistoquímica o un ensayo cromogénico. En otra realización, se somete a prueba a los niveles del ARNm del FVII mediante un ensayo, tal como un ensayo de ADN ramificado, o un ensayo de transferencia Northern o RT-PCR.
- En una realización, el agente —por ejemplo, una composición que incluye la formulación lipídica mejorada— es evaluado en cuanto a su toxicidad. En otra realización adicional, el sujeto modelo puede ser monitorizado en busca de efectos físicos, tal como mediante un cambio en peso o su comportamiento en la jaula.
- En una realización, el método incluye, además, someter al agente —por ejemplo, una composición que comprenda la formulación lipídica mejorada— a una evaluación adicional. La evaluación adicional puede incluir, por ejemplo, (i) una repetición de la evaluación anteriormente descrita, (ii) una repetición de la anteriormente descrita con un número diferente de animales o con dosis diferentes, o (iii) mediante un método diferente —por ejemplo, la evaluación en otro modelo animal; por ejemplo, un primate no humano—.
- En otra realización, se adopta una decisión en cuanto a si incluir o no el agente y la formulación lipídica mejorada en estudios adicionales, tales como en un ensayo clínico, dependiendo del efecto observado del agente candidato sobre la proteína hepática o los niveles de ARNm. Por ejemplo, si se observa que un ARNbc candidato disminuye los niveles de proteína o ARNm en al menos un 20%, 30%, 40%, 50% o más, entonces el agente puede ser considerado para un ensayo clínico.
- En otra realización adicional, se adopta una decisión en cuanto a si incluir o no el agente y la formulación lipídica mejorada en una composición farmacéutica, dependiendo del efecto observado del agente candidato y del aminolípido sobre la proteína hepática o los niveles de ARNm. Por ejemplo, si se observa que un ARNbc candidato disminuye los niveles de proteína o ARNm en al menos un 20%, 30%, 40%, 50% o más, entonces el agente puede ser considerado para un ensayo clínico.
- En otro aspecto, en la presente memoria se describe un método de evaluación de la formulación lipídica mejorada en busca de su adecuación para la administración de un agente terapéutico a una célula. En algunas realizaciones, en la presente memoria se describe un método de evaluación de la formulación lipídica mejorada en cuanto a su adecuado para administrar un constructo a base de ARN; por ejemplo, un ARNbc que tenga FVII como diana. El método incluye proporcionar una composición que incluye un ARNbc que tiene como diana a FVII y a un aminolípido candidato, administrar la composición a un roedor —por ejemplo, un ratón—, evaluar la expresión de FVII en función de al menos uno del nivel de FVII en sangre o del nivel del ARNm del FVII en el hígado, evaluando con ello el aminolípido candidato.
- En algunas realizaciones, el método comprende, además, la comparación de la expresión del gen diana con un valor de referencia seleccionado de antemano.
- Las composiciones que incluyen componentes que contienen lípidos, tal como un liposoma, y estos son descritos en mayor detalle posteriormente. Agentes ejemplares a base de ácidos nucleicos incluyen los ARNbc, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, los microARN, oligonucleótidos estimulantes del sistema inmunitario u oligonucleótidos formadores de tripletes. Estos agentes también son descritos con mayor detalle posteriormente.
- “Alquilo” significa un hidrocarburo alifático saturado, cíclico o no cíclico, de cadena recta o ramificado que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Alquilos de cadena recta saturados representativos incluyen metilo, etilo, n-propilo, n-butilo, n-pentilo, n-hexilo y similares; mientras que los alquilos ramificados saturados incluyen isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo y similares. Alquilos cíclicos saturados representativos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y similares; mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen ciclopentenilo y ciclohexenilo y similares.
- “Alquenilo” significa un alquilo, definido anteriormente, que contiene al menos un doble enlace entre átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen isómeros tanto *cis* como *trans*. Alquenos representativos de cadena recta y ramificados incluyen etilenilo, propilenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutenilo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo y similares.
- “Alquinilo” significa cualquier alquilo o alquenilo, definido anteriormente, que, además, contiene al menos un triple enlace entre carbonos adyacentes. Alquinilos representativos de cadena recta y ramificados incluyen acetilenilo, propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1 butinilo y similares.
- “Acilo” significa cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo en el que el carbono en el punto de unión es sustituido con un grupo oxo, definido posteriormente. Por ejemplo, -C(=O)alquilo, -C(=O)alquenilo y -C(=O)alquinilo son grupos acilo.

El término "arilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico, bicíclico, o tricíclico en el que puede sustituirse cualquier átomo del anillo. Ejemplos de restos de arilo incluyen, sin limitación, fenilo, naftilo, antraceno y pirenilo.

- 5 "Heterociclo" significa un anillo monocíclico de 5 a 7 miembros o uno bicíclico o heterocíclico de 7 a 10 miembros que es saturado, insaturado o aromático y que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente entre nitrógeno, oxígeno y azufre, y pudiendo estar los heteroátomos de nitrógeno y azufre opcionalmente oxidados, y pudiendo estar el heteroátomo de nitrógeno opcionalmente cuaternizado, incluyendo anillos bicíclicos en los que cualquiera de los anteriores heterociclos están fusionados a un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido mediante cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen heteroarilos, definidos posteriormente.
- 10 Los heterociclos incluyen morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo y similares.

- 15 Las expresiones "alquilo opcionalmente sustituido", "alquenilo opcionalmente sustituido", "alquinilo opcionalmente sustituido", "acilo opcionalmente sustituido" y "heterociclo opcionalmente sustituido" significan que, cuando están sustituidos, al menos un átomo de hidrógeno es remplazado con un sustituyente. En el caso de un sustituyente oxo (=O), se sustituyen dos átomos de hidrógeno. En este sentido, los sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR^x, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x y -SO_nNR^xR^y, siendo n 0, 1 o 2, siendo R^x y R^y iguales o diferentes e, independientemente, hidrógeno, alquilo o heterociclo, y pudiendo ser sustituido cada uno de dichos sustituyentes alquílicos y heterocíclicos, además, con uno o más de oxo, halógeno, -OH,
- 20 -CN, alquilo, -OR^x, heterociclo, -NR^xR^y, -NR^xC(=O)R^y, -NR^xSO₂R^y, -C(=O)R^x, -C(=O)OR^x, -C(=O)NR^xR^y, -SO_nR^x y -SO_nNR^xR^y.

- 25 El término "heteroarilo" se refiere a un sistema de anillo de hidrocarburo aromático monocíclico de 5-8 miembros, bicíclico de 8-12 miembros o tricíclico de 11-14 miembros que tiene 1-3 heteroátomos si es monocíclico, 1-6 heteroátomos si es bicíclico, o 1-9 heteroátomos si es tricíclico, estando seleccionados dichos heteroátomos de O, N o S (por ejemplo, átomos de carbono y 1-3, 1-6, o 1-9 heteroátomos de N, O o S si es monocíclico, bicíclico o tricíclico, respectivamente), pudiendo sustituirse cualquier átomo del anillo. Los grupos heteroarilo descritos en la presente memoria también pueden contener anillos fusionados que compartan un enlace común carbono-carbono. El término "alquilheterociclo" se refiere a un heteroarilo en el que al menos uno de los átomos del anillo está sustituido con alquilo, alquenilo o alquinilo.

- 30 El término "sustituido" se refiere a la sustitución de uno o más radicales de hidrógeno en una estructura dada con el radical de un sustituyente especificado, incluyendo, sin limitación: halo, alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, heterociclilo, tiol, alquiltio, oxo, tioxo, ariltio, alquiltioalquilo, ariltioalquilo, alquilsulfonilo, alquilsulfonilalquilo, arilsulfonilalquilo, alcoxi, ariloxi, aralcoxi, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, arilaminocarbonilo, alcoxycarbonilo, ariloxicarbonilo, haloalquilo, amino, trifluorometilo, ciano, nitro, alquilamino, arilamino, alquilaminoalquilo, arilaminoalquilo, aminoalquilamino,
- 35 hidroxilo, alcóxialquilo, carboxialquilo, alcoxycarbonilalquilo, aminocarbonilalquilo, acilo, aralcoxycarbonilo, ácido carboxílico, ácido sulfónico, sulfonilo, ácido fosfónico, arilo, heteroarilo, heterocíclico y alifático. Se entiende que el sustituyente puede ser sustituido ulteriormente. "Halógeno" significa flúor, cloro, bromo y yodo.

Los términos "alquilamina" y "dialquilamina" se refieren a radicales -NH(alquilo) y -N(alquilo)₂, respectivamente.

- 40 El término "alquilfosfato" se refiere a -O-P(Q')(Q'')-O-R, siendo cada uno de Q' y Q'', independientemente, O, S, N(R)₂, alquilo o alcoxi opcionalmente sustituido; y siendo R alquilo, ω-aminoalquilo u ω-aminoalquilo (sustituido) opcionalmente sustituido.

El término "alquilfosforotioato" se refiere a un alquilfosfato en el que al menos uno de Q' o Q'' es S.

El término "alquilfosfonato" se refiere a un alquilfosfato en el que al menos uno de Q' o Q'' es alquilo.

El término "hidroxialquilo" significa el radical -O-alquilo.

- 45 El término "alquilheterociclo" se refiere a un alquilo en el que al menos un metileno ha sido remplazado por un heterociclo.

El término "ω-aminoalquilo" se refiere a un radical -alquilo-NH₂. Y el término "ω-aminoalquilo (sustituido)" se refiere a un ω-aminoalquilo en el que al menos uno del H o el N ha sido remplazado con alquilo.

- 50 El término "ω-fosfoalquilo" se refiere a -alquilo-O-P(Q')(Q'')-O-R, siendo cada uno de Q' y Q'', independientemente, O o S, y R alquilo opcionalmente sustituido.

El término "ω-tiofosfoalquilo" se refiere a un ω-fosfoalquilo en el que al menos uno de Q' o Q'' es S.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden requerir el uso de grupos protectores. La metodología de grupos protectores es bien conocida para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS*, Green, T. W. et. al., Wiley-Interscience, Nueva York, 1999). Sucintamente,

los grupos protectores en el contexto aquí descrito son cualquier grupo que reduzca o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional. Un grupo protector puede ser añadido a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y luego ser eliminado para revelar el grupo funcional original. En algunas realizaciones se usa un "grupo protector de alcoholes". Un "grupo protector de alcoholes" es cualquier grupo que disminuya o elimine la reactividad no deseada de un grupo funcional alcohólico. Los grupos protectores pueden ser añadidos y eliminados usando técnicas muy conocidas en la técnica.

Partículas lipídicas

Los agentes y/o los aminolípidos para el ensayo en el modelo de detección hepática mostrado en la presente memoria pueden ser formados en partículas lipídicas. Las partículas lipídicas incluyen, sin limitación, liposomas. Según se usa en la presente memoria, un liposoma es una estructura que tiene membranas que contienen lípidos que rodean un interior acuoso. Los liposomas pueden tener una o más membranas de lípidos. Se contemplan tanto los liposomas de una sola capa, que son denominados unilamelares, como los liposomas de múltiples capas, que son denominados multilamelares. Cuando forman complejos con ácidos nucleicos, las partículas lipídicas también pueden ser lipoplejos, que están compuestos de bicapas de lípido catiónico encajonadas entre capas de ADN, según describe, por ejemplo, Felgner, *Scientific American*.

Las partículas lipídicas pueden incluir, además, uno o más lípidos adicionales y/u otros componentes, tal como colesterol. Pueden incluirse otros lípidos en las composiciones liposomales para diversos fines, tales como evitar la oxidación de los lípidos o para unir ligandos a la superficie del liposoma. Puede haber presente un número cualquiera de lípidos, incluyendo lípidos anfipáticos, neutros, catiónicos y aniónicos. Tales lípidos pueden ser usados solos o en combinación. A continuación se describen ejemplos específicos de componentes lipídicos adicionales que puede haber presentes.

Componentes adicionales que puede haber presentes en una partícula lipídica incluyen componentes estabilizantes bicapa, tales como oligómeros poliamídicos (véase, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.320.017), péptidos, proteínas, detergentes, derivados de lípidos, tales como PEG acoplado a fosfatidiletanolamina y PEG conjugado con ceramidas (véase la patente estadounidense nº 5.885.613). En algunas realizaciones, la partícula lipídica incluye un agente de acceso, tal como un lípido de acceso descrito en la presente memoria.

Una partícula lipídica puede incluir uno o más de un segundo aminolípido o lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroles y un lípido seleccionado para reducir la agregación de partículas lipídicas durante su formación, la cual puede ser resultado de la estabilización estérica de partículas, lo que impide la agregación inducida por cargas durante la formación.

Según se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión "lípido catiónico" incluya los lípidos que tienen una o dos cadenas de ácidos grasos o de alquilos grasos y un grupo funcional amino (incluyendo un grupo alquilamino o dialquilamino) que puedan ser protonados para formar un lípido catiónico a pH fisiológico. En algunas realizaciones, se denomina a un lípido catiónico "aminolípido".

Otros lípidos catiónicos incluirían los que tienen grupos de ácidos grasos alternativos y otros grupos dialquilamino, incluyendo aquellos en los que los sustituyentes alquílicos son diferentes (por ejemplo, N-etil-N-metilamino-, N-propil-N-etilamino- y similares). En general, son más fáciles de dimensionar los lípidos (por ejemplo, un lípido catiónico) que tengan cadenas acilo menos saturadas, en particular cuando los complejos están dimensionados por debajo de aproximadamente 0,3 micrómetros, con fines de esterilización de filtros. Se prefieren los lípidos catiónicos que contienen ácidos grasos insaturados con longitudes de la cadena de carbono en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. También pueden usarse otros supercántigos para separar el grupo amino (por ejemplo, el grupo amino del lípido catiónico) y la porción de ácido graso o alquilo graso del lípido catiónico. Los expertos en la técnica conocen supercántigos adecuados.

En ciertas realizaciones, los lípidos catiónicos tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de modo que el lípido esté cargado positivamente a un pH que coincida con el pH fisiológico (por ejemplo pH 7,4) o esté por debajo de él, y sea neutro a un segundo pH, preferentemente en el pH fisiológico o por encima de él. Tales lípidos también son denominados lípidos catiónicos. Se entenderá, naturalmente, que la adición o la eliminación de protones en función del pH es un proceso de equilibrio y que la referencia a un lípido cargado o neutro se refiere a la naturaleza de la especie predominante y no requiere que esté presente todo el líquido en forma cargada o neutra. En la presente memoria no se excluye a los lípidos que tienen más de un grupo protonable o desprotonable, o que son zwitteriónicos.

En ciertas realizaciones, los lípidos protonables (es decir, los lípidos catiónicos) tienen el pK_a del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. El pK_a más preferido se encuentra entre aproximadamente 4 y aproximadamente 7, porque estos lípidos serán catiónicos en una fase de formulación de pH menor, mientras que las partículas serán en gran medida (aunque no completamente) neutralizadas en la superficie a un pH fisiológico en torno al pH 7,4. Uno de los beneficios de este pK_a es que al menos algún ácido nucleico asociado con la superficie exterior de la partícula perderá su interacción electrostática al pH fisiológico y será eliminado por simple diálisis, reduciendo así enormemente la susceptibilidad de la partícula a su eliminación.

5 Ejemplos de lípidos que reducen la agregación de partículas durante la formación incluyen lípidos modificados con polietilenglicol (PEG), monosialogangliósido Gml, y oligómeros poliamídicos ("PAO"), tales como los descritos en la patente estadounidense nº 6.320.017. Para su uso, como en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria, también pueden acoplarse con lípidos otros compuestos con restos de barrera estérica hidrófilos no cargados —como PEG, Gml o ATTA—, que impiden la agregación durante la formulación. Los ATTA-lípidos son descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 6.320.017, y los conjugados PEG-lípido son descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses nºs 5.820.873, 5.534.499 y 5.885.613. Normalmente, la concentración del componente lipídico seleccionado para reducir la agregación está entre aproximadamente un 1 y un 15% (en porcentaje molar de lípidos).

10 Ejemplos de lípidos que reducen la agregación y/o son adecuados para su conjugación con agentes de ácido nucleico que pueden ser usados en el modelo de detección hepática son lípidos modificados con polietilenglicol (PEG), monosialogangliósido Gml y oligómeros poliamídicos ("PAO"), tales como los descritos en la patente estadounidense nº 6.320.017. Para su uso, como en los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria, también pueden acoplarse con lípidos otros compuestos con restos de barrera estérica hidrófilos no cargados —como PEG, Gml o ATTA—, que impiden la agregación durante la formulación. Los ATTA-lípidos son descritos, por ejemplo, en la patente estadounidense nº 6.320.017, y los conjugados PEG-lípido son descritos, por ejemplo, en las patentes estadounidenses nºs 5.820.873, 5.534.499 y 5.885.613. Normalmente, la concentración del componente lipídico seleccionado para reducir la agregación está entre aproximadamente un 1 y un 15% (en porcentaje molar de lípidos).

20 Ejemplos específicos de lípidos modificados con PEG (o conjugados lípido-polioxi-etileno) que son útiles en la presente memoria pueden tener diversas porciones lipídicas de "anclaje" para fijar la porción de PEG a la superficie de la vesícula lipídica. Ejemplos de lípidos adecuados modificados con PEG incluyen fosfatidiletanolamina modificada con PEG y ácido fosfatídico, conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20) que están descritos en el documento, en tramitación como el presente, USSN 08/486.214, dialquilaminas modificadas con PEG y 1,2-diaciloxipropan-3-aminas modificadas con PEG. Se prefieren en particular los diacilgliceroles y los dialquilgliceroles modificados con PEG. En algunas realizaciones, el total porcentual molar de los PEG-lípidos dentro de una partícula es aproximadamente un 1,5% molar. Por ejemplo, cuando la partícula incluye varios PEG-lípidos descritos en la presente memoria, tal como un lípido modificado con PEG descrito anteriormente y un lípido de acceso que contiene PEG, siendo la cantidad total de los lípidos que contienen PEG, cuando se toman en conjunto, aproximadamente un 1,5% molar.

30 En realizaciones en las que se conjuga un resto estéricamente grande, tal como PEG o ATTA, con un ancla lipídica, la selección del ancla lipídica depende de qué tipo de asociación ha de tener el conjugado con la partícula lipídica. Es bien sabido que el mePEG (mw2000)-diestearoilfosfatidiletanolamina (PEG-DSPE) quedará asociado con un liposoma hasta que la partícula sea eliminada de la circulación, posiblemente en cuestión de días. Otros conjugados, tal como PEG-CerC20, tienen una capacidad de permanencia similar. Sin embargo, PEG-CerC14 se intercambia rápidamente, desapareciendo de la formulación, tras su exposición al suero, con un $T_{1/2}$ inferior a 60 minutos en algunos ensayos. Según se ilustra en la solicitud de patente estadounidense con nº de serie 08/486.214, al menos tres características influyen en la tasa de intercambio: longitud de la cadena acílica, saturación de la cadena acílica y tamaño del grupo funcional de barrera estérica. Aquí pueden ser útiles compuestos que tengan variaciones adecuadas de estas características. Para algunas aplicaciones terapéuticas puede resultar preferible que el lípido modificado con PEG se elimine rápidamente de la partícula de ácido nucleico-lípido *in vivo* y, por ende, que el lípido modificado con PEG posea anclas lipídicas relativamente cortas. En otras aplicaciones terapéuticas puede resultar preferible que la partícula de ácido nucleico-lípido presente una vida circulatoria en el plasma más larga y, por ende, el lípido modificado con PEG poseerá anclas lipídicas relativamente más largas. Anclas lipídicas ejemplares incluyen las que tienen longitudes entre aproximadamente C_{14} y aproximadamente C_{22} , preferentemente entre aproximadamente C_{14} y aproximadamente C_{16} . En algunas realizaciones, un resto de PEG —por ejemplo un mPEG-NH₂— tiene un tamaño de aproximadamente 1000, 2000, 5000, 10.000, 15.000 o 20.000 daltones.

50 Debería hacerse notar que los compuestos que impiden la agregación no requieren necesariamente una conjugación con lípidos para funcionar debidamente. El PEG libre o el ATTA libre en solución puede ser suficiente para evitar la agregación. Si las partículas son estables después de su formulación, el PEG o el ATTA puede ser eliminado por diálisis antes de la administración a un sujeto.

55 Cuando están presentes en la partícula lipídica, los lípidos neutros pueden ser cualesquiera de varias especies lipídicas que existen en forma zwitteriónica neutra o no cargada al pH fisiológico. Tales lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomielina, dihidroesfingomielina, cefalina y cerebrósidos. La selección de lípidos neutros para ser usados en las partículas de la presente memoria se describe generalmente guiados por la consideración de, por ejemplo, el tamaño del liposoma y la estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Preferentemente, el componente lipídico neutro es un lípido que tiene dos grupos acilo, (es decir, diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina). Lípidos que tienen diversos grupos de cadena acílica de longitud de cadena y grado de saturación variables están disponibles o pueden ser aislados o sintetizados mediante técnicas muy conocidas. En un grupo de realizaciones, se prefieren los lípidos que contienen ácidos grasos saturados con longitudes de la cadena de carbono en el intervalo de C_{14} a C_{22} . En otro grupo de realizaciones, se usan lípidos con ácidos grasos mono o diinsaturados con longitudes de la cadena de carbono en el intervalo de C_{14} a C_{22} . Además, pueden usarse lípidos que tengan mezclas de cadenas de ácidos grasos saturados e insaturados. Preferentemente,

los lípidos neutros aquí usados son DOPE, DSPC, DPPC, POPC, o cualquier fosfatidilcolina afín. Los lípidos neutros útiles aquí usados también pueden estar compuestos de esfingomielina, dihidroesfingomielina, o fosfolípidos con otros grupos funcionales, tales como serina e inositol.

5 El componente de esteroles de la mezcla lipídica, cuando esté presente, puede ser cualquiera de los esteroides usados convencionalmente en el campo de la preparación de liposomas, vesículas lipídicas o partículas lipídicas. Un esteroles preferente es el colesterol.

En las partículas lipídicas descritas en la presente memoria también pueden incluirse otros lípidos catiónicos, que transporten una carga neta positiva a aproximadamente el pH fisiológico, además de los descritos específicamente descritos más arriba. Tales lípidos catiónicos incluyen, sin limitación, cloruro N,N-dioleil-N,N-dimetilamónico ("DODAC"); cloruro N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N-trietilamónico ("DOTMA"); bromuro N,N-diesteiril-N,N-dimetilamónico ("DDAB"); cloruro N-(2,3-dioleiloxi)propil-N,N,N-trimetilamónico ("DOTAP"); sal cloruro de 1,2-dioleiloxi-3-trimetilaminopropano ("DOTAP.Cl"); 3 β -(N-(N',N'-dimetilamino)etano)-carbamoil)colesterol ("DC-Chol"), trifluoracetato N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N-2-(espermincarboxamido)etil-N,N-dimetilamónico ("DOSPA"), carboxispermina dioctadecilamidoglicérica ("DOGS"), 1,2-dioleil-sn-3-fosfoetanolamina ("DOPE"), 1,2-dioleil-3-dimetilamonio propano ("DODAP"), N,N-dimetil-2,3-dioleiloxi)propilamina ("DODMA") y bromuro de N-(1,2-dimiristiloxi)prop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxi)etil amónico ("DMRIE"). Además, pueden usarse varias preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, por ejemplo, LIPOFECTINA (que incluye DOTMA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL) y LIPOFECTAMINA (que comprende DOSPA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL). En realizaciones particulares, un lípido catiónico es un aminolípido.

20 Los lípidos aniónicos adecuados para ser usados en partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen, sin limitación, fosfatidilglicerol, cardiolipina, diacilfosfatidilserina, ácido diacilfosfatídico, fosfatidiletanolamina N-dodecanoílica, fosfatidiletanolamina N-succinílica, fosfatidiletanolamina N-glutarílica, lisilfosfatidilglicerol, y otros grupos modificantes aniónicos unidos a lípidos neutros.

En numerosas realizaciones, se incluyen lípidos anfipáticos en partículas lipídicas descritas en la presente memoria. "Lípidos anfipáticos" se refiere a cualquier material adecuado en el que la porción hidrófoba del material lipídico se oriente hacia una fase hidrófoba, mientras que la porción hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Tales compuestos incluyen, sin limitación, fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Fosfolípidos representativos incluyen esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, fosfatidilcolina palmitoiloleílica, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleilfosfatidilcolina (DOPC), diesteirilfosfatidilcolina (DSPC), colina dimiristoilfosfatídica (DMPC) o dilinleilfosfatidilcolina (DLPC). También pueden usarse otros compuestos carentes de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y β -aciloxiácidos. Además, tales lípidos anfipáticos pueden ser fácilmente mezclados con otros lípidos, tales como triglicéridos y esteroides.

35 También adecuados para su inclusión en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria son los lípidos de fusión programable. Tales partículas lipídicas tienen poca tendencia a fusionarse con membranas celulares y a distribuir su carga útil hasta que se produzca un evento señal dado. Esto permite que la partícula lipídica se distribuya más uniformemente después de la inyección en un organismo o en un sitio de enfermedad antes de que empiece a fusionarse con las células. El evento señal puede ser, por ejemplo, un cambio en pH, temperatura, entorno iónico o tiempo. En este caso, un componente de demora o "encubrimiento" de la fusión, tal como un conjugado ATTA-lípido o un conjugado PEG-lípido, puede ser simplemente intercambiado, desapareciendo de la membrana de la partícula lipídica con el tiempo. Anclas lipídicas ejemplares incluyen las que tienen longitudes entre aproximadamente C₁₄ y aproximadamente C₂₂, preferentemente entre aproximadamente C₁₄ y aproximadamente C₁₆. En algunas realizaciones, un resto de PEG —por ejemplo un mPEG-NH₂— tiene un tamaño de aproximadamente 1000, 2000, 5000, 10.000, 15.000 o 20.000 daltones.

45 Para el momento en el que la partícula lipídica está adecuadamente distribuida en el cuerpo, ha perdido suficiente agente de encubrimiento para que sea fusogénica. Con otros eventos señal, resulta deseable escoger una señal que esté asociada con el sitio de enfermedad o con una célula diana, tal como mayor temperatura en un sitio de inflamación.

Una partícula lipídica conjugada con un agente de ácido nucleico también puede incluir un resto de acceso; por ejemplo, un resto de acceso que sea específico a un tipo de célula o a un tejido. El direccionamiento de partículas lipídicas a dianas usando diversos restos de acceso, tales como ligandos, receptores de la superficie celular, glicoproteínas, vitaminas (por ejemplo, riboflavina) y anticuerpos monoclonales, ha sido descrito anteriormente (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses n^{os} 4.957.773 y 4.603.044). Restos ejemplares de acceso incluyen un lípido de acceso, tal como un lípido de acceso descrito en la presente memoria. En algunas realizaciones, el lípido de acceso es una GalNAc que contiene lípido de acceso, tal como GalNAc3-DSG y GalNAc3-PEG-DSG, descritos en la presente memoria. Los restos de acceso pueden incluir toda la proteína o fragmentos de la misma. Los mecanismos de acceso generalmente requieren que los agentes de acceso estén situados en la superficie de la partícula lipídica de tal manera que el resto de acceso esté disponible para la interacción con la diana; por ejemplo, un receptor de la superficie celular. En la técnica se conocen y hay disponibles diversos agentes y métodos de acceso, incluyendo los descritos, por

ejemplo, en Sapra, P. y Allen, TM, *Prog. Lipid Res.* 42(5):439-62 (2003); y Abra, RM et al., *J. Liposome Res.* 12:1-3, (2002).

Se ha propuesto el uso de partículas lipídicas —es decir, liposomas— con un recubrimiento superficial de cadenas de polímeros hidrófilos, tales como cadenas de polietilenglicol (PEG) para el acceso a dianas (Allen, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1237: 99-108 (1995); DeFrees, et al., *Journal of the American Chemistry Society* 118: 6101-6104 (1996); Blume, et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1149: 180-184 (1993); Klivanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); la patente estadounidense nº 5.013.556; Zalipsky, *Bioconjugate Chemistry* 4: 296-299 (1993); Zalipsky, *FEBS Letters* 353: 71-74 (1994); Zalipsky, en *Stealth Liposomes*, Capítulo 9 (Lasic y Martin, Ed.) CRC Press, Boca Ratón, Florida (1995). En un planteamiento, un ligando, tal como un anticuerpo, para direccionar la partícula lipídica está ligado al grupo funcional polar de lípidos que forman la partícula lipídica. En otro planteamiento, el ligando de acceso está unido a los extremos distales de las cadenas de PEG que forman el recubrimiento de polímero hidrófilo (Klivanov, et al., *Journal of Liposome Research* 2: 321-334 (1992); Kirpotin et al., *FEBS Letters* 388: 115-118 (1996)).

Pueden usarse métodos estándar para el acoplamiento con los agentes diana. Por ejemplo, pueden usarse fosfatidiletanolamina, que puede ser activada para la unión de los agentes diana, o compuestos lipófilos derivatizados, tales como la bleomicina derivatizada por lípidos. Pueden construirse liposomas diana de anticuerpos usando, por ejemplo, liposomas que incorporen la proteína A (véanse Renneisen, et al., *J. Bio. Chem.*, 265:16337-16342 (1990) y Leonetti, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 87:2448-2451 (1990)). La patente estadounidense nº 6.027.726 da a conocer otros ejemplos de conjugación de anticuerpos. Los ejemplos de restos de acceso también pueden incluir otras proteínas específicas a componentes celulares, incluyendo antígenos asociados con neoplasias o tumores. Las proteínas usadas como restos de acceso pueden unirse a los liposomas mediante enlaces covalentes (véase Heath, *Covalent Attachment of Proteins to Liposomes*, 149, *Methods in Enzymology* 111-119 (Academic Press, Inc. 1987)). Otros métodos de acceso incluyen el sistema de biotina-avidina.

En una realización ejemplar, la partícula lipídica comprende una mezcla del lípido catiónico de la presente invención, lípidos neutros (distintos del lípido catiónico), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-DMG o un PEG-cDMA). En ciertas realizaciones, la mezcla lipídica consiste o consiste esencialmente en el lípido catiónico de la presente invención, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG. En realizaciones adicionales preferentes, la partícula lipídica consiste o consiste esencialmente en la anterior mezcla lipídica en proporciones molares de aproximadamente 20-70% de DLin-M-C3-DMA:5-45% de lípido neutro:20-55% de colesterol:0,5-15% de lípido modificado con PEG.

En realizaciones particulares, la partícula lipídica consiste o consiste esencialmente en DLin-M-C3-DMA, DSPC, colesterol, y PEG-DMG o PEG-cDMA, por ejemplo, en una proporción molar de aproximadamente 20-60% de DLin-M-C3-DMA:5-25% de DSPC:25-55% de colesterol:0,5-15% de PEG-DMG o PEG-cDMA. En realizaciones particulares, la proporción molar de lípidos es aproximadamente 40/10/40/10 (porcentajes molares de DLin-M-C3-DMA/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA), 35/15/40/10 (porcentajes molares de DLin-M-C3-DMA/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA) o 52/13/30/5 (porcentajes molares de DLin-M-C3-DMA/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA).

En otro grupo de realizaciones, en estas composiciones el lípido neutro, DSPC, es sustituido con POPC, DPPC, DOPE o SM.

40 **Composiciones y formulaciones de partículas de agente terapéutico-lípido**

En la presente memoria se describen composiciones que comprenden una partícula lipídica descrita en la presente memoria y un agente activo, en las que el agente activo está asociado con la partícula lipídica. En realizaciones particulares, el agente activo es un agente terapéutico. En realizaciones particulares, el agente activo está encapsulado en el interior acuoso de la partícula lipídica. En otras realizaciones, el agente activo está presente dentro de una o más capas lipídicas de la partícula lipídica. En otras realizaciones, el agente activo está unido a la superficie lipídica exterior o interior de una partícula lipídica.

“Completamente encapsulado”, tal como se usa en la presente memoria, indica que el ácido nucleico de las partículas no se degrada de manera significativa después de la exposición a un ensayo con suero o una nucleasa que degradaría significativamente ADN libre. En un sistema completamente encapsulado, preferentemente, se degrada menos del 25% del ácido nucleico de las partículas en un tratamiento que normalmente degradaría el 100% del ácido nucleico libre, más preferentemente menos del 10%, siendo lo más preferible que se degrade menos del 5% del ácido nucleico de las partículas. Alternativamente, la encapsulación completa puede ser determinada mediante un ensayo Oligreen®. Oligreen® es una tinción de ácido nucleico fluorescente ultrasensible para cuantificar oligonucleótidos y ADN monocatenario en solución (disponible en Invitrogen Corporation, Carlsbad, California). Completamente encapsulado también sugiere que las partículas son estables en suero; es decir, que no se descomponen rápidamente en sus partes componentes tras su administración *in vivo*.

Los agentes activos, tal como se usan en la presente memoria, incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado en una célula, un tejido, un órgano o un sujeto. Tales efectos pueden ser, por ejemplo,

biológicos, fisiológicos o cosméticos. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto, incluyendo, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos y polipéptidos, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos, tales como, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes y anticuerpos Primatizados™, citocinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de la diferenciación, receptores de la superficie celular y sus ligandos; hormonas; y moléculas pequeñas, incluyendo moléculas o compuestos orgánicos pequeños.

En una realización, el agente activo es un agente terapéutico, o una sal o un derivado del mismo. Los derivados de agentes terapéuticos pueden ser terapéuticamente activos ellos mismos o pueden ser profármacos, que se vuelven activos tras una modificación ulterior. Así, en una realización, un derivado de agente terapéutico retiene parte o la totalidad de la actividad terapéutica del agente no modificado, mientras que en otra realización un derivado de agente terapéutico carece de actividad terapéutica.

En diversas realizaciones, los agentes terapéuticos incluyen cualquier agente o fármaco terapéuticamente eficaz, tales como compuestos antiinflamatorios, antidepressivos, estimulantes, analgésicos, antibióticos, medicación para el control de la natalidad, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la transducción de señales, fármacos cardiovasculares —por ejemplo, agentes antiarrítmicos—, vasoconstrictores, hormonas y esteroides.

En ciertas realizaciones, el agente terapéutico es un fármaco oncológico, que también puede ser denominado fármaco antitumoral, fármaco anticancerígeno o fármaco tumoral, un agente antineoplásico o similares. Ejemplos de fármacos oncológicos que pueden usarse incluyen, sin limitación, adriamicina, alquerano, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, azatioprina, bexaroteno, biCNU, bleomicina, busulfan intravenoso, busulfan oral, capecitabina (Xeloda), carboplatino, carmustina, CCNU, celecoxib, clorambucilo, cisplatino, cladribina, ciclosporina A, citarabina, arabinósido de citosina, daunorrubicina, Cytoxan, daunorrubicina, dexametasona, dexrazoxano, dodecaxel, doxorubicina, doxorubicina, DTIC, epirubicina, estramustina, fosfato de etopósido, etopósido y VP- 16, exemestano, FK506, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, gemcitabina (Gemzar), gemtuzumab-ozogamicina, acetato de goserelina, hidrea, hidroxiaurea, idarrubicina, ifosfamida, mesilato de imatinib, interferón, irinotecán (Camptostar, CPT-111), letrozol, leucovorina, leustatina, leuprolida, levamisol, litretinoína, megastrol, melfalán, L-PAM, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza nitrogenada, paclitaxel, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfímero sódico, prednisona, rituxano, estreptoizocina, STI-571, tamoxifeno, taxotere, temozolamida, tenipósido, VM-26, topotecán (Hycamtin), toremifeno, tretinoína, ATRA, valrubicina, velbán, vinblastina, vincristina, VP16 y vinorelbina. Otros ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden usar son elipticina y análogos o derivados de la elipticina, epotilonas, inhibidores de quinasas intracelulares y camptotecinas.

Partículas de ácido nucleico-lípido

En ciertas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria están asociadas con un ácido nucleico, dando lugar a una partícula de ácido nucleico-lípido. En realizaciones particulares, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica. Según se usa en la presente memoria, se pretende que la expresión “ácido nucleico” incluya cualquier oligonucleótido o polinucleótido. Los fragmentos que contienen hasta 50 nucleótidos se generalmente denominados oligonucleótidos, y los fragmentos mayores son denominados polinucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria tienen una longitud de 20-50 nucleótidos.

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

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

El ácido nucleico que está presente en una partícula de lípido-ácido nucleico descrita en la presente memoria incluye cualquier forma de ácido nucleico que sea conocida. Los ácidos nucleicos usados en la presente memoria pueden ser ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario o híbridos de ADN-ARN. Ejemplos de ADN bicatenario incluyen genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y terminación, y sistemas autorreplicantes tales como ADN viral o plasmídico. Ejemplos de ARN bicatenario incluyen ARNip y otros reactivos de interferencia por ARN. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN, y oligonucleótidos formadores de tripletes.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden ser de longitudes diversas, generalmente dependientes de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o los genes pueden tener una longitud entre aproximadamente 1.000 y 100.000 residuos de nucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden tener una longitud que oscila entre aproximadamente 10 y 100 nucleótidos. En diversas realizaciones afines, los oligonucleótidos, tanto monocatenarios como bicatenarios como tricatenarios, pueden tener una longitud que oscila entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 50 nucleótidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 nucleótidos.

En realizaciones particulares, un oligonucleótido (o una cadena del mismo) descrito en la presente memoria se hibrida específicamente con un polinucleótido diana o es complementario del mismo. “Específicamente hibridable” y “complementario” son términos que son usados para indicar un grado suficiente de complementariedad, de modo que se produzca una unión estable y específica entre el ADN o ARN diana y el oligonucleótido. Se entiende que no es preciso que un oligonucleótido sea 100% complementario con su secuencia de ácidos nucleicos diana para que sea específicamente hibridable. Un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido con la diana interfiere en la función normal de la molécula diana, causando una pérdida de utilidad o de la expresión de la misma, y hay suficiente grado de complementariedad para evitar la unión inespecífica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica; es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o de tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en las que se realizan los ensayos. Así, en otras realizaciones, este oligonucleótido incluye 1, 2 o 3 sustituciones de bases con respecto a la región de un gen o de la secuencia de ARNm a la que selecciona como diana o con la que se hibrida específicamente.

Ácidos nucleicos de interferencia por ARN

En realizaciones particulares, las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria están asociadas con moléculas de interferencia por ARN (iARN). Pueden emplearse métodos de interferencia por ARN usando moléculas de iARN para alterar la expresión de un gen o polinucleótido de interés. En los últimos 5 años, el ARN interferente pequeño (ARNip) ha sustituido esencialmente a los ODN y ribozimas antisentido como fármacos en desarrollo de la próxima generación de oligonucleótidos seleccionados como diana. Los ARNip son dobletes de ARN normalmente de 21-30 nucleótidos de longitud que pueden asociarse con un complejo multiproteínico citoplasmático denominado complejo de silenciamiento inducido por iARN (RISC). El RISC cargado con ARNip arbitra la degradación de los transcritos de ARNm homólogos; por lo tanto, puede diseñarse un ARNip para eliminar la expresión de proteínas con alta especificidad. A diferencia de otras tecnologías antisentido, la función del ARNip a través de un mecanismo natural evolucionó para controlar la expresión génica a través de ARN no codificante. Generalmente, se considera que esta es la razón por la que su actividad es más potente *in vitro* e *in vivo* que tanto las ribozimas o el ODN antisentido. Actualmente, hay en desarrollo farmacéutico diversos reactivos de iARN, incluyendo ARNip, que seleccionan dianas clínicamente relevantes, según se describe, por ejemplo, en De Fougères, A. et al., *Nature Reviews* 6:443-453 (2007).

Aunque las primeras moléculas descritas de iARN fueron híbridos ARN:ARN que comprendían tanto un ARN sentido como una cadena de ARN antisentido, ahora se ha demostrado que los híbridos de ADN sentido:ARN antisentido, los híbridos de ARN sentido:ADN antisentido, y los híbridos de ADN:ADN son capaces de arbitrar la iARN (Lamberton, J.S. y Christian, A.T., (2003) *Molecular Biotechnology* 24:111-119). Así, en la presente memoria se incluye el uso de moléculas de iARN que comprenden cualquiera de estos diferentes tipos de moléculas bicatenarias. Además, se entiende que las moléculas de iARN pueden ser usadas y ser introducidas en las células de formas diversas. En consecuencia, según se usa en la presente memoria, “moléculas de iARN” abarca cualquier molécula, y todas ellas, capaz de inducir una respuesta de iARN en las células, incluyendo, sin limitación, polinucleótidos bicatenarios que comprenden dos cadenas separadas —es decir, una cadena sentido y una cadena antisentido; por ejemplo, ARN interferente pequeño (ARNip)—; polinucleótidos que comprenden un bucle en horquilla de secuencias complementarias, que forma una región bicatenaria —por ejemplo, moléculas iARNhc, y vectores de expresión que expresan uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido bicatenario solo o en combinación con otro polinucleótido—.

Un “compuesto de ARNip monocatenario”, tal como se usa en la presente memoria, es un compuesto de ARNip que está formado de una sola molécula. Puede incluir una región bicatenaria, formada por un emparejamiento intracatenario; por ejemplo, puede ser, o incluir, una estructura en horquilla o con forma de mango de sartén. Los compuestos de ARNip monocatenario pueden ser antisentido con respecto a la molécula diana.

Un compuesto de ARNip monocatenario puede ser suficientemente largo para que pueda entrar en el RISC y participar en la escisión, arbitrada por el RISC, de un ARNm diana. Un compuesto de ARNip monocatenario tiene una longitud de al menos 14, y, en otras realizaciones, al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40 o 50 nucleótidos. En ciertas realizaciones, tiene una longitud menor de 200, 100 o 60 nucleótidos.

Los compuestos de ARNip en horquilla tendrán una región bicatenaria igual o al menos de 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24 o 25 pares de nucleótidos. La región bicatenaria podrá ser igual o menor que 200, 100 o 50 pares en longitud. En ciertas realizaciones, los intervalos para la región bicatenaria son 15-30, 17 a 23, 19 a 23, y 19 a 21 pares de nucleótidos en longitud. La horquilla puede tener una protuberancia monocatenaria o región terminal no emparejada.

En ciertas realizaciones, las protuberancias son de 2-3 nucleótidos en longitud. En algunas realizaciones, la protuberancia está en el lado sentido de la horquilla, y en algunas realizaciones en el lado antisentido de la horquilla.

5 Un “compuesto de ARNip bicatenario”, tal como se usa en la presente memoria, es un compuesto de ARNip que incluye más de una cadena y, en algunos casos, más de dos cadenas, en el que la hibridación intercatenaria puede formar una región de estructura bicatenaria.

10 La cadena antisentido de un compuesto de ARNip bicatenario puede ser igual o al menos de 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40 o 60 nucleótidos en longitud. Puede ser igual o menor que 200, 100 o 50 nucleótidos en longitud. Los intervalos pueden ser de 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos en longitud. Según se usa en la presente memoria, la expresión “cadena antisentido” significa la cadena de un compuesto de ARNip que es suficientemente complementaria de una molécula diana; por ejemplo, un ARN diana.

La cadena sentido de un compuesto de ARNip bicatenario puede ser igual o al menos de 14, 15, 16 17, 18, 19, 25, 29, 40 o 60 nucleótidos en longitud. Puede ser igual o menor que 200, 100 o 50 nucleótidos en longitud. Los intervalos pueden ser de 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos en longitud.

15 La porción bicatenaria de un compuesto de ARNip bicatenario puede ser igual o al menos de 14, 15, 16 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 o 60 pares de nucleótidos en longitud. Puede ser igual o al menos de 200, 100 o 50 pares de nucleótidos en longitud. Los intervalos pueden ser de 15-30, 17 a 23, 19 a 23, y 19 a 21 pares de nucleótidos en longitud.

20 En muchas realizaciones, el compuesto de ARNip es suficientemente grande para poder ser escindido por una molécula endógena —por ejemplo, por Dicer— para producir compuestos de ARNip menores; por ejemplo, agentes ARNip.

25 Las cadenas sentido y antisentido pueden ser elegidas de modo que el compuesto de ARNip bicatenario incluya una sola cadena o región no emparejada en uno o ambos extremos de la molécula. Así, un compuesto de ARNip bicatenario puede contener cadenas sentido y antisentido, emparejadas para contener una protuberancia, por ejemplo, una o dos protuberancias 5' o 3', o una protuberancia 3' de 1 - 3 nucleótidos. Las protuberancias pueden ser resultado de que una cadena sea más larga que la otra, o resultado de que dos cadenas de la misma longitud se escalonen. Algunas realizaciones tendrán al menos una protuberancia 3'. En una realización, ambos extremos de una molécula de ARNip tendrán una protuberancia 3'. En algunas realizaciones, la protuberancia es de 2 nucleótidos.

30 En ciertas realizaciones, la longitud para la región bicatenaria se encuentra entre 15 y 30, o de 18, 19, 20, 21, 22 y 23 nucleótidos en longitud; por ejemplo, en la gama de compuestos de iARNmc anteriormente expuesta. Los compuestos iARNmc pueden asemejarse en longitud y estructura a los de productos naturales procesados por Dicer a partir de iARNbc largos. También se incluyen realizaciones en las que las dos cadenas del compuesto de iARNmc están ligadas; por ejemplo, ligadas de forma covalente. También están dentro de la invención estructuras en horquilla u otras monocatenarias que proporcionan la requerida región bicatenaria, y una protuberancia 3'.

35 Los compuestos de ARNip aquí descritos, incluyendo compuestos de ARNip bicatenario y compuestos de ARNip monocatenario, pueden arbitrar el silenciamiento de un ARN diana; por ejemplo, ARNm —por ejemplo, un transcrito de un gen que codifica una proteína—. Por conveniencia, tal ARNm también es denominado en la presente memoria ARNm que ha de ser silenciado. Tal gen también es denominado gen diana. En general, el ARN que ha de ser silenciado es un gen endógeno o un gen patógeno. Además, también pueden seleccionarse como diana ARN distintos del ARNm; por ejemplo, los ARNt y los ARN virales.

40 Según se usa en la presente memoria, la frase “arbitra la iARN” se refiere a la capacidad de silenciar, de forma específica a la secuencia, un ARN diana. Sin desear entrar en consideraciones teóricas, se cree que el silenciamiento usa la maquinaria o el proceso de iARN y un ARN guía; por ejemplo, un compuesto de iARNmc de 21 a 23 nucleótidos.

45 En una realización, un compuesto de ARNip es “suficientemente complementario” de un ARN diana —por ejemplo, un ARNm diana— para que el compuesto de ARNip silencie la producción de la proteína codificada por el ARNm diana. En otra realización, por ejemplo, el compuesto de ARNip es “exactamente complementario” de un ARN diana, el ARN diana y el compuesto de ARNip se hibridan, formando, por ejemplo, un híbrido hecho exclusivamente de pares de bases de Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un ARN diana “suficientemente complementario” puede incluir una región interna (por ejemplo, de al menos 10 nucleótidos) que sea exactamente complementaria de un ARN diana. Además, en ciertas realizaciones, el compuesto de ARNip discrimina específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el compuesto de ARNip solo arbitra la iARN si se encuentra un complementario exacto en la región (por ejemplo, dentro de 7 nucleótidos de la diferencia de un solo nucleótido).

55 Puede usarse la interferencia por ARN (iARN) para inhibir específicamente la expresión de polinucleótidos diana. La suspensión de un gen y la expresión de ácidos nucleicos arbitradas por ARN bicatenario pueden ser logradas introduciendo ARNbc, ARNip o ARNhc en las células o los organismos. El ARNip puede ser ARN bicatenario, o una molécula híbrida que comprenda tanto ARN como ADN; por ejemplo, una cadena de ARN y una cadena de ADN. Se ha demostrado que la introducción directa de los ARNip en una célula puede desencadenar la iARN en células de mamífero (Elshabir, S.M., et al. *Nature* 411:494-498 (2001)). Además, la supresión en células de mamífero se produjo

en el ámbito de ARN y fue específica para los genes seleccionados como diana, con una intensa correlación entre el ARN y la supresión proteínica (Caplen, N. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:9746-9747 (2001)). Además, se demostró que una amplia variedad de líneas celulares, incluyendo células HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 y MCF-7, es susceptible, a cierto nivel, de silenciamiento por ARNip (Brown, D. et al. *Tech Notes* 9(1): 1-7, disponible en Internet en www.ambion.com/techlib/tn/91/912.html (9/1/02)).

Las moléculas de iARN que seleccionan polinucleótidos específicos como diana pueden ser preparadas fácilmente según procedimientos conocidos en la técnica. Se han identificado las características estructurales de las moléculas de ARNip eficaces (Elshabir, S.M. et al. (2001) *Nature* 411:494-498 y Elshabir, S.M. et al. (2001), *EMBO* 20:6877-6888). En consecuencia, un experto en la técnica comprenderá que puede usarse una amplia variedad de diferentes moléculas de ARNip para seleccionar como diana un gen o transcrito específico. En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNip según la invención son bicatenarias y de 16 - 30 o 18 - 25 nucleótidos de longitud, incluyendo cada número entero intermedio. En una realización, un ARNip tiene 21 nucleótidos de longitud. En ciertas realizaciones, los ARNip tienen protuberancias 3' de 0-7 nucleótidos o protuberancias 5' de 0-4 nucleótidos. En una realización, una molécula de ARNip tiene una protuberancia 3' de dos nucleótidos. En una realización, un ARNip tiene 21 nucleótidos de longitud con protuberancias 3' de dos nucleótidos (es decir, contienen una región complementaria de 19 nucleótidos entre las cadenas sentido y antisentido). En ciertas realizaciones, las protuberancias son protuberancias 3' UU o dTT.

Generalmente, las moléculas de ARNip son completamente complementarias de una cadena de una molécula de ADN diana, dado que se ha demostrado que discrepancias de incluso un solo par de bases reducen el silenciamiento. En otras realizaciones, los ARNip pueden tener una composición de la cadena principal modificada, tal como, por ejemplo, modificaciones 2'-desoxi- o 2'-O-metilo. Sin embargo, en realizaciones preferentes, toda la cadena del ARNip no está hecha con bases modificadas ni con 2' desoxi ni con 2'-O.

En otra realización, en la presente memoria se describe una célula que incluye un vector para inhibir la expresión de un gen en una célula. El vector incluye una secuencia reguladora ligada operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica al menos una cadena de uno de los ARNbc descritos en la presente memoria.

En una realización, los sitios diana de ARNip se seleccionan haciendo un barrido de la secuencia del transcrito del ARNm diana en busca de la incidencia de secuencias AA de dinucleótidos. Cada secuencia AA de dinucleótidos en combinación con la 3' adyacente de aproximadamente 19 nucleótidos son sitios diana potenciales de ARNip. En una realización, los sitios diana de ARNip están situados, preferentemente, dentro de las regiones no traducidas (UTR) 5' y 3' o de las regiones cercanas al codón de iniciación (dentro de aproximadamente 75 bases), dado que las proteínas que enlazan las regiones reguladoras pueden interferir en el enlace del complejo RNPIp endonucleasa (Elshabir, S. et al. *Nature* 411:494-498 (2001); Elshabir, S. et al. *EMBO J.* 20:6877-6888 (2001)). Además, los sitios diana potenciales pueden ser comparados con una base de datos de genomas apropiados, tal como BLASTN 2.0.5, disponible en el servidor del NCBI en www.ncbi.nlm, y ser eliminadas las secuencias diana potenciales de homología significativa con otras secuencias codificantes.

En realizaciones particulares, los ARN horquillados cortos constituyen el componente de ácido nucleico de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria. El ARN horquillado corto (ARNhc) es una forma de ARN horquillado capaz de reducir, de forma específica a la secuencia, la expresión de un gen diana. Los ARN horquillados cortos pueden ofrecer una ventaja con respecto a los ARNip en la supresión de la expresión de genes, ya que son generalmente más estables y menos susceptibles a la degradación en el entorno celular. Se ha establecido que tal silenciamiento de genes arbitrado por el ARN horquillado corto funciona en diversas líneas celulares normales y cancerosas, y en células de mamífero, incluyendo células murinas y humanas (Paddison, P. et al., *Genes Dev.* 16(8):948-58 (2002)). Además, se han generado líneas celulares transgénicas que portan genes cromosómicos que codifican ARNhc diseñados por ingeniería genética. Estas células son capaces de sintetizar constitutivamente los ARNhc, facilitando con ello un silenciamiento duradero o constitutivo de genes que pueden ser transmitidos a células descendientes (Paddison, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(3):1443-1448 (2002)).

Los ARNhc contienen una estructura de tallo-bucle. En ciertas realizaciones, pueden contener longitudes de tallo variables, normalmente de 19 a 29 nucleótidos de longitud, o cualquier número intermedio. En ciertas realizaciones, las horquillas contienen tallos de 19 a 21 nucleótidos, mientras que en otras realizaciones las horquillas contienen tallos de 27 a 29 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el tamaño del bucle tiene entre 4 y 23 nucleótidos de longitud, aunque el tamaño del bucle puede ser mayor que 23 nucleótidos sin afectar significativamente a la actividad de silenciamiento. Las moléculas de ARNhc pueden contener discrepancias —por ejemplo discrepancias G-U— entre las dos cadenas del tallo de ARNhc sin disminuir su potencia. De hecho, en ciertas realizaciones, los ARNhc están diseñados para que incluyan uno o varios emparejamientos G-U en el tallo de la horquilla para estabilizar las horquillas durante su propagación, por ejemplo, en bacterias. Sin embargo, normalmente se requiere la complementariedad entre la porción del tallo que se enlaza con el ARNm diana (cadena antisentido) y el ARNm, y una discrepancia incluso de un solo par de bases en esta región puede abolir el silenciamiento. No se requieren las protuberancias 5' y 3', dado que no parece que sean críticas para la función del ARNhc, aunque pueden estar presentes (Paddison et al. (2002) *Genes & Dev.* 16(8):948-58).

Los micro ARN

Los micro ARN (miARN) son una clase muy conservada de moléculas de ARN pequeño que son transcritas a partir del ADN de los genomas de plantas y animales, pero no son traducidas a proteína. Los miARN procesados son moléculas de ARN monocatenario de ~17-25 nucleótidos (nt) que se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y han sido identificados como reguladores clave del desarrollo, de la proliferación, la apoptosis y la diferenciación celulares. Se cree que desempeñan un papel en la regulación de la expresión génica enlazándose a la región 3' no traducida de ARNm específicos. El RISC arbitra la regulación a la baja de la expresión génica a través de una inhibición de la traducción, de la escisión de transcritos o ambos. El RISC también está implicado en el silenciamiento transcripcional en el núcleo de una amplia gama de eucariotas.

El número de secuencias de miARN identificadas hasta la fecha es grande y está en aumento, ejemplos ilustrativos de las cuales pueden encontrarse, por ejemplo, en: "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature" Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. *NAR*, 2006, 34, Database Issue, D140-D144; "The microRNA Registry" Griffiths-Jones S. *NAR*, 2004, 32, Database Issue, D109-D111; y también en Internet en microARN.dot.sanger.dot.ac.dot.uk/sequences/.

15 Oligonucleótidos antisentido

En una realización, un ácido nucleico es un oligonucleótido antisentido dirigido a un polinucleótido diana. Se pretende que la expresión "oligonucleótido antisentido" o simplemente "antisentido" incluya oligonucleótidos que son complementarios de una secuencia de polinucleótidos seleccionada como diana. Los oligonucleótidos antisentido son cadenas únicas de ADN o ARN que son complementarias de una secuencia elegida. En el caso del ARN antisentido, impiden la traducción de cadenas complementarias de ARN enlazándose con él. El ADN antisentido puede ser usado para seleccionar como diana un ARN complementario específico (codificante o no codificante). Si el enlace tiene lugar, este híbrido de ADN/ARN puede ser degradado por la enzima RNasa H. En una realización particular, los oligonucleótidos antisentido contienen entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos, más preferentemente entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos. La expresión también abarca oligonucleótidos antisentido que pueden no ser exactamente complementarios del gen diana. Así, la invención puede ser utilizada en casos en los que se encuentran actividades no específicas a la diana con el antisentido, o en las que una secuencia antisentido que contiene una o más discrepancias con la secuencia diana es la más preferida para un uso particular.

Se ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido son inhibidores eficaces y selectivos de la síntesis de proteínas y, en consecuencia, pueden ser usados para inhibir específicamente la síntesis proteínica por parte de un gen seleccionado 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 muscarínico de acetilcolina de tipo 2 son inhibidos por los oligonucleótidos antisentido dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (patente estadounidense 5.739.119 y patente estadounidense 5.759.829). Además, se han demostrado ejemplos de inhibición antisentido con la proteína nuclear ciclina, el gen de resistencia múltiple a fármacos (MDG1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, el receptor estriatal GABA_A y el EGF humano (Jaskulski et al., *Science*, 10 de junio de 1988, 240(4858):1544-6; Vasanthakumar y Ahmed, *Cancer Commun.* 1989;1(4):225-32; Peris et al., *Brain Res Mol Brain Res.*, 15 de junio de 1998, 57(2):310-20; la patente estadounidense 5,801,154; la patente estadounidense 5,789,573; la patente estadounidense 5,718,709 y la patente estadounidense 5,610,288). Además, también se han descrito constructos antisentido que inhiben y pueden ser usados para tratar diversas proliferaciones celulares anormales, por ejemplo cáncer (patente estadounidense 5.747.470; patente estadounidense 5.591.317 y patente estadounidense 5.783.683).

En la técnica se conocen métodos de producción de oligonucleótidos antisentido y pueden ser fácilmente adaptados para producir un oligonucleótido antisentido que seleccione como diana cualquier secuencia de polinucleótidos. La selección de secuencias de oligonucleótidos antisentido específicos para una secuencia diana dada se basa en el análisis de la secuencia diana elegida y en la determinación de la estructura secundaria, la T_m, la energía de enlace y la estabilidad relativa. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser seleccionados en función de su incapacidad relativa de formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían el enlace específico con el ARNm diana en una célula anfitriona. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm incluyen las regiones del codón AUG de iniciación de la traducción y las secuencias que son sustancialmente complementarias de las regiones 5' del ARNm. Estos análisis de la estructura secundaria y estas consideraciones de la selección de sitios pueden llevarse a cabo, por ejemplo, usando la versión 4 del soporte lógico OLIGO de análisis de cebadores (Molecular Biology Insights) y/o el soporte lógico algorítmico BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., *Nucleic Acid Res.* 1997, 25(17):3389-402).

Antagomires

Los antagomires son oligonucleótidos de tipo ARN que albergan diversas modificaciones para la protección de RNAsa y propiedades farmacológicas, tales como captación mejorada tisular y celular. Difieren del ARN normal, por ejemplo, por la completa metilación 2'-O del azúcar, la cadena principal de fosforotioato y, por ejemplo, un resto de colesterol en el extremo 3'. Los antagomires pueden ser usados para silenciar de forma eficaz miARN endógenos formando dobletes que comprenden el antagomir y miARN endógeno, impidiendo con ello el silenciamiento génico inducido por miARN. Un ejemplo de silenciamiento del miARN arbitrado por antagomires es el silenciamiento de miR-122, descrito

en Krutzfeldt et al, *Nature*, 2005, 438: 685-689. Los ARN antagomíricos pueden ser sintetizados usando protocolos estándar de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida. Véanse las solicitudes de patente estadounidense n^{os} 11/502.158 y 11/657.341.

5 Un antagomir puede incluir subunidades de monómeros conjugadas por ligandos y monómeros para la síntesis de oligonucleótidos. La solicitud estadounidense n^o 10/916.185, presentada el 10 de agosto de 2004, describe monómeros ejemplares. Un antagomir puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en la solicitud PCT n^o PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004. Se puede hacer que un antagomir forme un complejo con un resto anfipático. La solicitud PCS n^o PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004 describe restos anfipáticos ejemplares para ser usados con agentes de oligonucleótidos.

10 Aptámeros

Los aptámeros son moléculas de ácido nucleico o péptido que se enlazan con una molécula particular de interés con gran afinidad y especificidad (Tuerk y Gold, *Science* 249:505 (1990); Ellington y Szostak, *Nature* 346:818 (1990)). Se han producido con éxito aptámeros de ADN o ARN que se enlazan con muchas entidades diferentes, desde proteínas grandes a moléculas orgánicas pequeñas (véanse Eaton, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1:10-16 (1997), Famulok, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:324-9(1999), y Hermann y Patel, *Science* 287:820-5 (2000)). Los aptámeros pueden ser a base de ARN o ADN, y pueden incluir un *riboswitch*. Un *riboswitch* es una parte de una molécula de ARNm que puede enlazarse directamente con una molécula diana pequeña y cuyo enlace con la diana afecta a la actividad del gen. Así, un ARNm que contiene un *riboswitch* está directamente implicado en la regulación de su propia actividad, dependiendo de la presencia o ausencia de su molécula diana. Generalmente, los aptámeros son diseñados a través de reiteradas rondas de selección *in vitro* o, de forma equivalente, de SELEX (evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial) para que se enlacen con dianas moleculares diversas, tales como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. El aptámero puede ser preparado mediante método conocido, incluyendo métodos sintéticos, recombinantes y de purificación, y puede ser usado solo o en combinación con otros aptámeros específicos para la misma diana. Además, según se describe más plenamente en la presente memoria, el término "aptámero" incluye específicamente los "aptámeros secundarios", que contienen una secuencia de consenso derivada de comparar dos o más aptámeros conocidos de una diana dada.

Ribozimas

Según otra realización descrita en la presente memoria, las partículas de ácido nucleico-lípido se asocian con ribozimas. Las ribozimas son complejos proteínicos de ARN que tienen dominios catalíticos específicos que poseen actividad de endonucleasa (Kim y Cech, *Proc Natl Acad Sci USA*, diciembre de 1987, 84(24):8788-92; Forster y Symons, *Cell*, 24 de abril de 1987;49(2):211-20). Por ejemplo, un gran número de ribozimas acelera las reacciones de transferencia de fosfoéster con un elevado grado de especificidad, escindiendo a menudo únicamente uno de varios fosfoésteres en un sustrato de oligonucleótido (Cech et al., *Cell*, diciembre de 1981, 27(3 Pt 2):487-96; Michel y Westhof, *J Mol Biol.*, 5 de diciembre de 1990, 216(3):585-610; Reinhold-Hurek y Shub, *Nature*, 14 de mayo de 1992, 357(6374):173-6). Esta especificidad ha sido atribuida al requisito de que el sustrato se enlace, mediante interacciones específicas de emparejamiento de bases, a la secuencia guía interna ("IGS") de la ribozima antes de la reacción química.

En la actualidad se conocen al menos seis variedades básicas de ARN enzimáticas que se dan de forma natural. Cada una puede catalizar la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del ARN *in trans* (y puede, así, escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan enlazándose en primer lugar con un ARN diana. Tal enlace se produce a través de la porción de enlace diana de un ácido nucleico enzimático que es mantenido en estrecha proximidad a una porción enzimática de la molécula que actúa escindiendo el ARN diana. Así, el ácido nucleico enzimático reconoce en primer lugar un ARN diana, y luego se enlaza con él, a través de un emparejamiento de bases complementarias, y una vez enlazado al sitio debido, actúa enzimáticamente cortando el ARN diana. La escisión estratégica de tal ARN diana destruirá su capacidad de dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya enlazado con su ARN diana y lo haya escindido, se libera de ese ARN para buscar otra diana y puede enlazarse reiteradamente con nuevas dianas y escindir las.

La molécula de ácido nucleico enzimático puede formarse, por ejemplo, en un motivo en cabeza de martillo, en horquilla, en un virus de hepatitis δ , en un intrón del grupo I o ARN de RNAsaP (en asociación con una secuencia guía de ARN) o en ARN de *Neurospora VS*. Rossi et al. *Nucleic Acids Res.*, 11 de septiembre de 1992, 20(17):4559-65 describen ejemplos específicos de motivos en cabeza de martillo. Hampel et al. (publicación de solicitud de patente europea n^o EP 0360257), Hampel y Tritz, *Biochemistry*, 13 de junio de 1989, 28(12):4929-33; Hampel et al., *Nucleic Acids Res.*, 25 de enero de 1990, 18(2):299-304 y la patente estadounidense 5.631.359 describen ejemplos de motivos en horquilla. Perrotta y Been, *Biochemistry*, 1 de diciembre de 1992, 31(47):11843-52 describen un ejemplo del motivo en el virus de hepatitis δ ; Guerrier-Takada et al., *Cell*, diciembre de 1983, 35(3 Pt 2):849-57 describen un ejemplo del motivo en RNAsaP; Collins (Saville y Collins, *Cell*, 18 de mayo de 1990, 61(4):685-96; Saville y Collins, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1 de octubre de 1991, 88(19):8826-30; Collins y Olive, *Biochemistry*, 23 de marzo de 1993, 32(11):2795-9) describen el motivo de la ribozima de ARN en *Neurospora VS*; y la patente estadounidense 4.987.071 describe un ejemplo del intrón del Grupo I. Características importantes de las moléculas de ácido nucleico enzimático usadas según la invención son que tienen un sitio de enlace al sustrato específico que es complementario del uno o más de

las regiones de ADN o ARN del gen diana, y tienen secuencias de nucleótidos dentro del sitio de enlace al sustrato, o rodeándolo, que imparten a la molécula una actividad de escisión del ARN. Así, no es preciso que los constructos de ribozimas estén limitados a los motivos específicos mencionados en la presente memoria.

5 En la técnica se conocen métodos de producción de una ribozima dirigida a una secuencia de polinucleótidos. Las ribozimas pueden ser diseñadas según se describe en la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 93/23569 y en la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 94/02595, y ser sintetizadas para ser sometidas a ensayo *in vitro* e *in vivo*, según se describe en esos documentos.

10 La actividad de las ribozimas puede ser optimizada alterando la longitud de los brazos de enlace de la ribozima o sintetizando ribozimas con modificaciones que impidan su degradación por las ribonucleasas séricas (véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 92/07065; la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 93/15187; la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 91/03162; la publicación de solicitud de patente europea nº 92110298.4; la patente estadounidense 5.334.711; y la publicación de solicitud de patente internacional nº WO 94/13688, que describen diversas modificaciones químicas que pueden hacerse a los restos de azúcar de moléculas enzimáticas de ARN), modificaciones que potencian su eficacia en las células, y
15 eliminación de bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis del ARN y reducir los requisitos químicos.

La solicitud de patente estadounidense 60/379.343, la solicitud de patente estadounidense con nº de serie 09/649.527, la publicación internacional WO 02/069369, la publicación internacional nº WO 01/15726, la patente estadounidense nº 6,406,705, y Raney et al., *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298:1185-1192 (2001) describen secuencias adicionales de ácidos nucleicos específicas de oligonucleótidos (ODN) adecuados para su uso
20 en las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los ODN usados en las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria tienen una cadena principal de fosfodiéster ("PO") o una cadena principal de fosforotioato ("PS"), y/o al menos un residuo de citosina metilada en un motivo CpG.

Modificaciones de ácidos nucleicos

25 En la década de 1990, los oligodesoxinucleótidos (ODN) y las ribozimas (RNA) antisentido a base de ADN representaron un apasionante nuevo paradigma para el diseño y el desarrollo de fármacos, pero su aplicación *in vivo* fue impedida por la actividad de la endo y la exo-nucleasa, así como por falta de una administración intracelular con éxito. El problema de la degradación fue superado de manera efectiva tras una amplia investigación sobre las modificaciones químicas que impedían que los (oligo)fármacos de oligonucleótidos fueran reconocidos por las enzimas de nucleasa, pero no inhibían su mecanismo de acción. Esta investigación tuvo tanto éxito que los fármacos de ODN
30 antisentido en desarrollo en la actualidad permanezcan intactos *in vivo* durante días, en comparación con minutos para las moléculas no modificadas (Kurreck, J. 2003. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur J Biochem* 270:1628-44). Sin embargo, los problemas de la administración intracelular y del mecanismo de acción han limitado hasta ahora que los ODN y las ribozimas antisentido lleguen a ser productos clínicos.

35 Los dobletes de ARN son inherentemente más estables a las nucleasas que el ADN o el ARN monocatenario, y, a diferencia de los ODN antisentido, los ARNip no modificados presentan buena actividad una vez que acceden al citoplasma. Aun así, las modificaciones químicas desarrolladas para estabilizar los ODN y las ribozimas antisentido han sido aplicadas sistemáticamente al ARNip para determinar cuánta modificación química se puede tolerar y si puede mejorarse la actividad farmacocinética y farmacodinámica. La interferencia por ARN por parte de dobletes de
40 ARNip requiere una cadena antisentido y sentido, que tengan funciones diferentes. Ambas son necesarias para permitir que el ARNip entre en el RISC, pero, una vez cargado, las dos cadenas se separan, y la cadena sentido se degrada, mientras que la cadena antisentido permanece para guiar el RISC al ARNm diana. La entrada en el RISC es un proceso que es estructuralmente menos estricto que el reconocimiento y la escisión del ARNm diana. En consecuencia, son posibles muchas modificaciones químicas diferentes de la cadena sentido, pero la cadena
45 antisentido solo tolera cambios limitados (Zhang et al., 2006).

Como es sabido en la técnica, un nucleósido es una combinación de base-azúcar. Los nucleótidos son nucleósidos que, además, incluyen un grupo fosfato covalentemente unido a la porción de azúcar del nucleósido. Para los nucleósidos que incluyen un azúcar pentofuranosílico, el grupo fosfato puede estar enlazado con el resto hidroxilo del
50 azúcar, ya sea en 2', 3' o 5'. En la formación de oligonucleótidos, los grupos fosfato enlazados covalentemente entre sí nucleósidos adyacentes, formando un compuesto polimérico lineal. A su vez, los respectivos extremos de esta estructura polimérica lineal pueden, además, unirse entre sí para formar una estructura circular. Dentro de la estructura del oligonucleótido, se suele decir que los grupos fosfato forman la cadena principal entre nucleósidos del oligonucleótido. El enlace normal o cadena principal del ARN y del ADN es un enlace fosfodiéster 3' a 5'.

55 El ácido nucleico que se usa en una partícula de lípido-ácido nucleico descrita en la presente memoria incluye cualquier forma de ácido nucleico que se conozca. Así, el ácido nucleico puede ser un ácido nucleico modificado del tipo anteriormente usado para potenciar la resistencia a la nucleasa y la estabilidad sérica. Sin embargo, sorprendentemente, también pueden prepararse productos terapéuticos aceptables usando el método descrito en la presente memoria para formular partículas de lípidos-ácidos nucleicos a partir de ácidos nucleicos que no tengan modificación alguna en los enlaces fosfodiéster de polímeros naturales de ácidos nucleicos, y el uso de ácidos

nucleicos con fosfodiésteres no modificados (es decir, ácidos nucleicos en los que todos los enlaces son enlaces fosfodiéster) es una realización preferente.

Modificaciones de las cadenas principales

5 El ARNip antisentido y otros oligonucleótidos útiles en la presente memoria incluyen, sin limitación, oligonucleótidos que contienen cadenas principales modificadas o enlaces no naturales entre nucleósidos. Los oligonucleótidos que tienen cadenas principales modificadas incluyen aquellos que retienen un átomo de fósforo en la cadena principal y los que no tienen un átomo de fósforo en la cadena principal. También se puede considerar que son oligonucleósidos los oligonucleótidos modificados que no tienen un átomo de fósforo en su cadena principal entre nucleósidos. Las cadenas principales de oligonucleótidos modificados incluyen, por ejemplo, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosforotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, fosfonatos metílicos y alquílicos de otro tipo —incluyendo fosfonatos de 3'-alquileo y fosfonatos quirales—, fosfinatos, fosforamidatos, incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosforotriésteres, fosforoselenato, metilfosfonato, o enlaces O-alquilo fosfotriéster, y boranofosfatos que tienen enlaces normales 3'-5', o análogos de estos ligados en 2'-5', y los que tienen polaridad invertida en los que los pares adyacentes de unidades de nucleósido están ligadas 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. En la Tabla 2 se muestran ejemplos particulares no limitantes de modificaciones particulares que pueden estar presentes en un ácido nucleico descritos en la presente memoria.

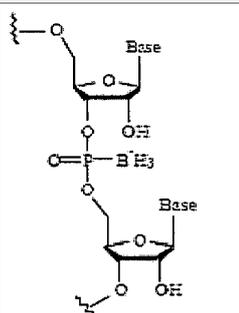
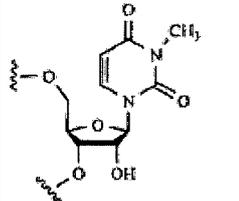
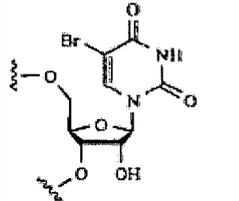
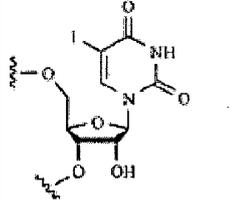
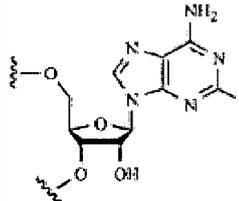
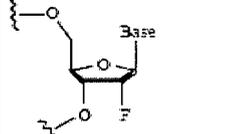
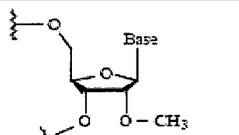
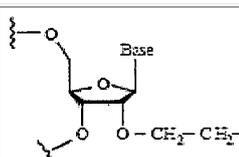
También se incluyen diversas sales, sales mixtas y formas ácidas libres. Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de los anteriores enlaces incluyen, sin limitación, las patentes estadounidenses n^{os} 3.687.808, 4.469.863, 4.476.301, 5.023.243, 5.177.196, 5.188.897, 5.264.423, 5.276.019, 5.278.302, 5.286.717, 5.321.131, 5.399.676, 5.405.939, 5.453.496, 5.455.233, 5.466.677, 5.476.925, 5.519.126, 5.536.821, 5.541.306, 5.550.111, 5.563.253, 5.571.799, 5.587.361 y 5.625.050.

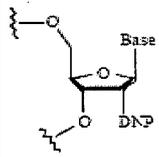
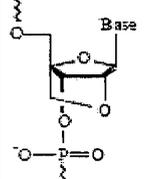
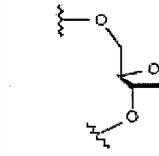
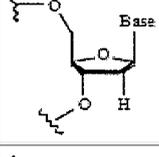
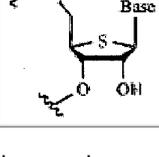
En ciertas realizaciones, las cadenas principales con oligonucleótidos modificados que no incluyen un átomo de fósforo en las mismas tienen un cadenas principales que se forman mediante enlaces internucleósido de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, enlaces internucleósido mixtos de heteroátomo y alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleósido heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta. Estos incluyen, por ejemplo, los que tienen enlaces morfolino (formados en parte a partir de la porción de azúcar de un nucleósido); cadenas principales de siloxano; cadenas principales de sulfuro, sulfóxido y sulfona; cadenas principales de formacetilo y tioformacetilo; cadenas principales formacéticas y tioformacéticas de metileno; cadenas principales que contienen alquenos; cadenas principales de sulfamato; cadenas principales de metilenoimino y metilenoimidracina; cadenas principales de sulfonato y sulfonamida; cadenas principales de amida; y otras que tienen partes componentes mixtas de N, O, S y CH₂. Patentes estadounidenses representativas que describen los anteriores oligonucleósidos incluyen, sin limitación, las patentes estadounidenses n^{os} 5.034.506, 5.166.315, 5.185.444, 5.214.134, 5.216.141, 5.235.033, 5.264.562, 5.264.564, 5.405.938, 5.434.257, 5.466.677, 5.470.967, 5.489.677, 5.541.307, 5.561.225, 5.596.086, 5.602.240, 5.610.289, 5.602.240, 5.608.046, 5.610.289, 5.618.704, 5.623.070, 5.663.312, 5.633.360, 5.677.437 y 5.677.439.

35 La modificación de la cadena principal de fosforotioato (Tabla 3, n^o 1), en la que un oxígeno no puente en el enlace fosfodiéster es sustituido por azufre, es uno de los medios primeros y más comunes desplegados para estabilizar fármacos de ácido nucleico contra la degradación por la nucleasa. En general, parece que pueden efectuarse extensas modificaciones de PS a ambas cadenas del ARNip sin mucho impacto en la actividad (Kurreck, J., *Eur. J. Biochem.* 270:1628-44, 2003). Sin embargo, se sabe que los oligos PS se asocian ávidamente no específicamente con proteínas, resultando en toxicidad, especialmente tras administración i.v. Por lo tanto, la modificación de PS suele estar restringida a una o dos bases en los extremos 3' y 5'. El conector boranofosfato (Tabla 3, n^o 2) es una modificación reciente que, según parece, es más estable que PS, potencia la actividad del ARNip y tiene baja toxicidad (Hall et al., *Nucleic Acids Res.* 32:5991-6000, 2004).

Tabla 3. Modificaciones químicas aplicadas al ARNip y a otros ácidos nucleicos

Nº	Abreviatura	Nombre	Sitio de la modificación	Estructura
1	PS	Fosforotioato	Cadena principal	

Nº	Abreviatura	Nombre	Sitio de la modificación	Estructura
2	PB	Boranofosfato	Cadena principal	
3	N3-MU	N3-metil-uridina	Base	
4	5'-BU	5'-bromo-uracilo	Base	
5	5'-IU	5'-iodo-uracilo	Base	
6	2,6-DP	2,6-diaminopurina	Base	
7	2'-F	2'-Fluoro	Azúcar	
8	2'-OME	2'-O-metilo	Azúcar	
9	2'-O-MOE	2'-O-(2-metoxietilo)	Azúcar	

Nº	Abreviatura	Nombre	Sitio de la modificación	Estructura
10	2'-DNP	2'-O-(2,4-dinitrofenilo)	Azúcar	
11	LNA	Ácido nucleico bloqueado (puente de metileno que conecta el oxígeno 2' con el carbono 4' del anillo de ribosa)	Azúcar	
12	2'-Amino	2'-amino	Azúcar	
13	2'-desoxi	2'-desoxi	Azúcar	
14	4'-tio	4'-tio-ribonucleótido	Azúcar	

Otros derivados útiles de los ácidos nucleicos incluyen las moléculas de ácidos nucleicos en las que los átomos de oxígeno que hacen de puentes (los que forman los enlaces fosfoéster) han sido sustituidos con -S-, -NH-, -CH₂- y similares. En ciertas realizaciones, las alteraciones al antisentido, al ARNip o a otros ácidos nucleicos usados no afectarán completamente a las cargas negativas asociadas con los ácidos nucleicos. Así, se contempla el uso del antisentido, del ARNip y de otros ácidos nucleicos en los que una porción de los enlaces es sustituida, por ejemplo, con los enlaces neutros metálicos de fosfonato o fosforamido. Cuando se usan enlaces neutros, en ciertas realizaciones, se sustituye menos del 80% de los enlaces de ácido nucleico, o se sustituye menos del 50% de los enlaces.

5

Modificaciones de bases

10 Las modificaciones de bases son menos comunes que las de la cadena principal y el azúcar. Todas las modificaciones mostradas en 0.3-6 parecen estabilizar el ARNip contra las nucleasas y tienen poco efecto en la actividad (Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C., Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. *Curr Top Med Chem* 6:893-900).

15 En consecuencia, los oligonucleótidos también pueden incluir modificaciones o sustituciones de nucleobase (a menudo denominada en la técnica simplemente "base"). Según se usan en la presente memoria, las nucleobases "no modificadas" o "naturales" incluyen las bases purínicas adenina (A) y guanina (G), y las bases pirimidínicas timina (T), citosina (C) y uracilo (U). Las nucleobases modificadas incluyen otras nucleobases sintéticas y naturales, tales como 5-metilcitosina (5-me-C o m5c), citosina 5-hidroximetílica, xantina, hipoxantina, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-propilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 2-tiouracilo, 2-tiotimina y 2-tiocitosina, 5-halouracilo y citosina, uracilo 5-propinílico y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo 8-hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-halo —en particular 5-bromo—, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina y 7-metiladenina, 8-azaguanina y 8-azaadenina, 7-deazaguanina y 7-deazaadenina y 3-deazaguanina y 3-deazaadenina.

20

25 Ciertas nucleobases son particularmente útiles para aumentar la afinidad de enlace de los compuestos oligoméricos descritos en la presente memoria, incluyendo pirimidinas 5 sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina. Se ha demostrado que las sustituciones de 5-metilcitosina aumentan la estabilidad del doblete de ácido nucleico en 0,6-1,2°C. (Sanghvi, Y. S.,

Crooke, S. T. y Lebleu, B., ed., *Antisense Research and Applications*, 1993, CRC Press, Boca Ratón, páginas 276-278). Estas pueden combinarse, en realizaciones particulares, con modificaciones de azúcares 2'-O-metoxietilo. Patentes estadounidenses que enseñan la preparación de algunas de estas nucleobases modificadas así como de otras nucleobases modificadas incluyen, sin limitación, la anteriormente señalada patente estadounidense nº 3.687.808, así como las patentes estadounidenses nºs 4.845.205, 5.130.302, 5.134.066, 5.175.273, 5.367.066, 5.432.272, 5.457.187, 5.459.255, 5.484.908, 5.502.177, 5.525.711, 5.552.540, 5.587.469, 5.594.121, 5.596.091, 5.614.617 y 5.681.941.

Modificaciones de azúcares

La mayoría de las modificaciones en el grupo de los azúcares se producen en la 2'-OH del anillo de azúcar del ARN, que proporciona un sitio reactivo químicamente conveniente (Manoharan, M. 2004. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr Opin Chem Biol* 8:570-9; Zhang, H.Y., Du, Q., Wahlestedt, C., Liang, Z. 2006. RNA Interference with chemically modified siRNA. *Curr Top Med Chem* 6:893-900). La 2'-F y la 2'-OME (0.7 y 8) son comunes y ambas aumentan la estabilidad; la modificación 2'-OME no reduce la actividad, siempre y cuando esté restringida a menos de 4 nucleótidos por cadena (Holen, T., Amarzguioui, M., Babaie, E., Prydz, H. 2003. Similar behaviour of single-strand and double-strand siRNAs suggests they act through a common RNAi pathway. *Nucleic Acids Res* 31:2401-7). La 2'-O-MOE (0.9) es sumamente efectiva en el ARNip cuando las bases modificadas están restringidas a la región central de la molécula (Prakash, T.P., Allerson, C.R., Dande, P., Vickers, T.A., Sioufi, N., Jarres, R., Baker, B.F., Swayze, E.E., Griffey, R.H., Bhat, B. 2005. Positional effect of chemical modifications on short interference RNA activity in mammalian cells. *J Med Chem* 48:4247-53). En 0.10-14 se muestran otras modificaciones que se ha descubierto que estabilizan el ARNip sin pérdida de actividad.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más restos de azúcares sustituidos. Se incluyen aquí, por ejemplo, oligonucleótidos que comprenden uno de los siguientes en la posición 2': OH; F; O-, S-, o N-alquilo, O-alquilo-O-alquilo, O-, S-, o N-alqueno u O-, S- o N-alquino, pudiendo ser el alquilo, el alqueno y el alquino alquilo C₁ a C₁₀ o alqueno y alquino C₂ a C₁₀ sustituidos o insustituidos. Se prefieren en particular O[(CH₂)_nO]_mCH₃, O(CH₂)_nOCH₃, O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, O(CH₂)_nONH₂, y O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, encontrándose n y m entre 1 y aproximadamente 10. Otros oligonucleótidos preferidos comprenden uno de los siguientes en la posición 2': alquilo inferior C₁ a C₁₀, alquilo inferior sustituido, alcarilo, aralquilo, O-alcarilo u O-aralquilo, SH, SCH₃, OCN, Cl, Br, CN, CF₃, OCF₃, SOCH₃, SO₂CH₃, ONO₂, NO₂, N₃, NH₂, heterocicloalquilo, heterocicloalcarilo, aminoalquilamino, polialquilamino, sililo sustituido, un grupo de escisión de ARN, un grupo indicador, un intercalador, un grupo para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un oligonucleótido, o un grupo para mejorar las propiedades farmacodinámicas de un oligonucleótido, y otros sustituyentes que tengan propiedades similares. Una modificación incluye 2'-metoxietoxi (2'-O--CH₂CH₂OCH₃, también denominado 2'-O-(2-metoxietil) o 2'-MOE) (Martin et al., *Helv. Chim. Acta* 1995, 78, 486-504); es decir, un grupo alcoxialcoxi. Otras modificaciones incluyen 2'-dimetilaminooxietoxi; es decir, un grupo O(CH₂)₂ON(CH₃)₂, también denominado 2'-DMAOE, y 2'-dimetilaminoetoxietoxi (2'-DMAEOE).

Modificaciones adicionales incluyen 2'-metoxi (2'-O--CH₃), 2'-aminopropoxi (2'-OCH₂CH₂CH₂NH₂) y 2'-fluoro (2'-F). También pueden hacerse modificaciones similares en otras posiciones en el oligonucleótido, en particular en la posición 3' del azúcar, en el nucleótido terminal 3' en los oligonucleótidos con enlace 2'-5' y la posición 5' del nucleótido terminal 5'. Los oligonucleótidos también pueden tener miméticos de azúcares, tales como restos de ciclobutilo en lugar del azúcar pentofuranosílico. Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de tales estructuras de azúcares modificados incluyen, sin limitación, las patentes estadounidenses nºs 4.981.957, 5.118.800, 5.319.080, 5.359.044, 5.393.878, 5.446.137, 5.466.786, 5.514.785, 5.519.134, 5.567.811, 5.576.427, 5.591.722, 5.597.909, 5.610.300, 5.627.053, 5.639.873, 5.646.265, 5.658.873, 5.670.633 y 5.700.920.

En otros miméticos de oligonucleótidos, tanto el azúcar como el enlace internucleósido —es decir, la cadena principal— de las unidades de nucleótido son sustituidos con grupos novedosos, aunque las unidades de bases se mantienen para su hibridación con un compuesto apropiado de ácido nucleico diana. Un compuesto oligomérico de ese tipo, un mimético de oligonucleótido que se ha demostrado que tiene excelentes propiedades de hibridación, es denominado ácido peptidonucleico (APN). En los compuestos de APN, la cadena principal de azúcar de un oligonucleótido es sustituida con una cadena principal que contiene amida, en particular una cadena principal de aminoetilglicina. Las nucleobases se retienen y están unidas directa o indirectamente a átomos de nitrógeno aza de la porción amídica de la cadena principal. Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de compuestos de APN incluyen, sin limitación, las patentes estadounidenses nºs 5.539.082, 5.714.331 y 5.719.262. Pueden encontrarse más enseñanzas sobre compuestos de APN en Nielsen et al. (*Science*, 1991, 254, 1497-1500).

Realizaciones particulares descritas en la presente memoria son oligonucleótidos con cadenas principales de fosforotioato y oligonucleósidos con cadenas principales con heteroátomos, y, en particular, --CH₂--NH--O--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--O--CH₂-- (denominada cadena principal de metileno (metilimino) o MMI) --CH₂--O--N(CH₃)--CH₂--, --CH₂--N(CH₃)--N(CH₃)--CH₂--y --O--N(CH₃)--CH₂--CH₂-- (representándose la cadena principal fosfodiéster nativa como --O--P--O--CH₂--) de la patente estadounidense nº 5.489.677 anteriormente referenciada, y las cadenas principales amídicas de la patente estadounidense nº 5.602.240 anteriormente referenciada. También se prefieren los oligonucleótidos que tienen estructuras de cadena principal de morfolino de la patente estadounidense nº 5.034.506 anteriormente referenciada.

El grupo de azúcar también puede contener uno o más carbonos que posean la configuración estereoquímica opuesta a la del correspondiente carbono en la ribosa. Así, un oligonucleótido puede incluir nucleótidos que contengan, por ejemplo, arabinosa como azúcar. El monómero puede tener un enlace alfa en la posición 1' en el azúcar; por ejemplo, alfa-nucleósidos. Los oligonucleótidos también pueden incluir azúcares "abásicos", que carecen de una nucleobase en C-1'. Estos azúcares abásicos también pueden contener, además, modificaciones en uno o más de los átomos constituyentes del azúcar. Los oligonucleótidos también pueden contener uno o más azúcares que tienen la forma L; por ejemplo, L-nucleósidos.

Oligonucleótidos quiméricos

No es necesario que todas las posiciones en un compuesto dado sean modificadas de manera uniforme y, de hecho, pueden incorporarse más de una de las modificaciones anteriormente mencionadas en un solo compuesto o incluso en un solo nucleósido dentro de un oligonucleótido. Ciertos oligonucleótidos preferidos descritos en la presente memoria son oligonucleótidos quiméricos. "Oligonucleótidos quiméricos" o "quimeras", en el contexto de la presente memoria, son oligonucleótidos que contienen dos o más regiones químicamente diferenciadas, cada una formada de al menos un nucleótido. Normalmente, estos oligonucleótidos contienen al menos una región de nucleótidos modificados que confiere una o más propiedades beneficiosas (tales como, por ejemplo, mayor resistencia a la nucleasa, mayor captación en las células, mayor afinidad de enlace hacia la diana de ARN) y una región que es un sustrato para la escisión por RNAsa H.

En una realización, un oligonucleótido quimérico comprende al menos una región modificada para aumentar la afinidad de enlace con la diana. La afinidad de un oligonucleótido hacia su diana se determina de forma rutinaria midiendo la T_m de un par oligonucleótido/diana, que es la temperatura a la cual el oligonucleótido y la diana se disocian; la disociación es detectada espectrofotométricamente. Cuanto mayor sea la T_m , mayor será la afinidad del oligonucleótido hacia la diana. En una realización, la región del oligonucleótido que es modificada para aumentar la afinidad de enlace con el ARNm diana comprende al menos un nucleótido modificado en la posición 2' del azúcar, siendo lo más preferible que se trate de un nucleótido modificado con 2'-O-alquilo, 2'-O-alquilo-O-alquilo o 2'-fluoro. Tales modificaciones se incorporan de forma rutinaria en oligonucleótidos, y se ha demostrado que estos oligonucleótidos tienen una T_m mayor (es decir, mayor afinidad de enlace con la diana) que los 2'-desoxioligonucleótidos contra una diana dada. El efecto de tal afinidad aumentada es potenciar enormemente la inhibición de la expresión del gen diana por parte del oligonucleótido.

En otra realización, un oligonucleótido quimérico comprende una región que actúa como sustrato para la RNAsa H. Se entiende, por supuesto, que los oligonucleótidos pueden incluir cualquier combinación de las diversas modificaciones descritas en la presente memoria.

Otra modificación de los oligonucleótidos descritos en la presente memoria implica enlazar químicamente al oligonucleótido uno o más restos o conjugados que potencien la actividad, la distribución celular o la captación celular del oligonucleótido. Tales conjugados y métodos de preparación de los mismos son conocidos en la técnica.

Los expertos en la técnica se percatarán de que, para su utilidad *in vivo*, tal como su eficacia terapéutica, una regla empírica razonable es que si una versión tiada de la secuencia funciona en la forma libre, también serán eficaces las partículas encapsuladas de la misma secuencia, de cualquier química. Las partículas encapsuladas puede también tener un intervalo más amplio de utilidad *in vivo*, mostrando eficacia en condiciones y modelos que no se sepa de otra manera que sean sensibles a una terapia antisentido. Los expertos en la técnica saben que, aplicando esta invención, pueden encontrar viejos modelos que ahora responden a una terapia antisentido. Además, pueden volver a examinar secuencias o químicas antisentido descartadas y encontrar eficacia empleando la invención.

Los oligonucleótidos usados según esta invención pueden ser creados de manera conveniente y rutinaria a través de la conocidísima técnica de síntesis en fase sólida. Los equipos para tal síntesis son vendidos por varias empresas, incluyendo a Applied Biosystems. También puede emplearse cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis en sí de los oligonucleótidos está plenamente dentro del acervo de los que la realizan de forma rutinaria. También es muy conocido el uso de técnicas similares para preparar otros oligonucleótidos como los fosforotioatos y los derivados alquilados.

Oligonucleótidos estimulantes del sistema inmunitario

Los ácidos nucleicos asociados con partículas lipídicas descritos en la presente memoria pueden ser estimulantes del sistema inmunitario, incluyendo los oligonucleótidos estimulantes del sistema inmunitario (ISS; mono o bicatenarios) capaces de inducir una respuesta inmunológica cuando son administrados a un sujeto, que puede ser un mamífero u otro paciente. Los ISS incluyen, por ejemplo, ciertos palíndromos que llevan a estructuras secundarias en horquilla (véase Yamamoto S., et al. (1992) *J. Immunol.* 148: 4072-4076), o motivos CpG, así como otras características conocidas de los ISS (tales como multidominios G; véase el documento WO 96/11266).

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

En realizaciones particulares, un ácido nucleico estimulante del sistema inmunitario es estimulante del sistema inmunitario únicamente cuando es administrado en combinación con una partícula lipídica, y no es estimulante del sistema inmunitario cuando es administrado en su "forma libre". Según la presente invención, se considera que tal oligonucleótido es estimulante del sistema inmunitario.

- 5 Se considera que los ácidos nucleicos estimulantes del sistema inmunitario no son específicos a secuencias cuando no se requiere que se enlacen específicamente a un polinucleótido diana y reduzcan la expresión del mismo para provocar una respuesta inmunitaria. Así, ciertos ácidos nucleicos estimulantes del sistema inmunitario pueden comprender una secuencia correspondiente a una región de un gen o ARNm que se da de manera natural, pero pueden seguir siendo considerados ácidos nucleicos estimulantes del sistema inmunitario no específicos a secuencias.
- 10 En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario comprende al menos un dinucleótido CpG. El oligonucleótido o dinucleótido CpG puede ser metilado o no metilado. En otra realización, el ácido nucleico estimulante del sistema inmunitario comprende al menos un dinucleótido CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el ácido nucleico comprende un único dinucleótido CpG, en el que la citosina de dicho dinucleótido CpG está metilada. En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5' TAACGTTGAGGGGCAT 3'. En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos CpG, en los que al menos una citosina de dichos dinucleótidos CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina de los dinucleótidos CpG presentes en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende varios dinucleótidos CpG, en los que al menos uno de dichos dinucleótidos CpG comprende una citosina metilada.
- 20 En una realización específica, el ácido nucleico comprende la secuencia 5' TTCCATGACGTTCTGACGT 3'. En otra realización específica, la secuencia del ácido nucleico comprende la secuencia 5' TCCATGACGTTCTGACGT 3', en la que las dos citosinas indicadas en negrita están metiladas. En realizaciones particulares, el ODN es seleccionado de un grupo de ODN constituido por ODN nº 1, ODN nº 2, ODN nº 3, ODN nº 4, ODN nº 5, ODN nº 6, ODN nº 7, ODN nº 8 y ODN nº 9, según se muestra a continuación.

25 **Tabla 4. Oligonucleótidos (ODN) ejemplares estimulantes del sistema inmunitario**

NOMBRE DEL ODN	ID SEC	SECUENCIA (5'-3') DEL ODN.
ODN 1 c-myc humano		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3
* ODN 1m		5'-TAAZGTTGAGGGGCAT-3
ODN 2		5'-TCCATGACGTTCTGACGTT-3
* ODN 2m		5'-TCCATGAZGTTCTGAZGTT-3
ODN 3		5'-TAAGCATAACGGGGTGT-3
ODN 5		5'-AACGTT-3
ODN 6		5'-GATGCTGTGTCGGGGTCTCCGGGC-3'
ODN 7		5'-TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT-3'
ODN 7m		5'-TZGTZGTTTTGTZGTTTTGTZGTT-3'
ODN 8		5'-TCCAGGACTTCTCTCAGGTT-3'
ODN 9		5'-TCTCCCAGCGTGCCCAT-3'
ODN 10 molécula 1 de adhesión intracelular murina		5'-TGCATCCCCCAGCCACCAT-3
ODN 11 molécula 1 de adhesión intracelular humana		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 12 molécula 1 de adhesión intracelular humana		5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
ODN 13 erb-B-2 humano		5'-GGT GCTCACTGC GGC-3'
ODN 14 c-myc humano		5'-AACC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 15 c-myc humano		5'-TAT GCT GTG CCG GGG TCT TCG GGC-3'
ODN 16		5'-GTGCCG GGGTCTTCGGGC-3'

NOMBRE DEL ODN	ID SEC	SECUENCIA (5'-3') DEL ODN.
ODN 17 receptor del factor 1 de crecimiento insulínico humano		5'-GGACCCCTCCTCCGGAGCC-3'
ODN 18 receptor del factor 1 de crecimiento insulínico humano		5'-TCC TCC GGA GCC AGA CTT-3'
ODN 19 receptor del factor de crecimiento epidérmico humano		5'-AAC GTT GAG GGG CAT-3'
ODN 20 receptor del factor de crecimiento epidérmico		5'-CCGTGGTCA TGCTCC-3'
ODN 21 factor de crecimiento endotelial vascular humano		5'-CAG CCTGGCTCACCG CCTTGG-3'
ODN 22 C – alfa fosfoquinasa murina		5'-CAG CCA TGG TTC CCC CCA AC-3'
ODN 23		5'-GTT CTC GCT GGT GAG TTT CA-3'
ODN 24 Bcl-2 humano		5'-TCT CCCAGCGTGCGCCAT-3'
ODN 25 C-Raf-s humano		5'-GTG CTC CAT TGA TGC-3'
ODN nº 26 receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular humano		5'-GAGUUCUGAUGAGGCCGAAAGG- CCGAAAGUCUG-3'
ODN nº 27		5'-RRCGY-3'
ODN nº 28		5'-AACGTTGAGGGGCAT-3'
ODN nº 29		5'-CAACGTTATGGGGAGA-3'
ODN nº 30 c-myc humano		5'-TAACGTTGAGGGGCAT-3'
"Z" representa un residuo metilado de citosina. ODN 14 es un oligonucleótido 15-mérico y ODN 1 es el mismo oligonucleótido que tiene añadida una timidina en el extremo 5', haciendo el ODN 1 16-mérico. No se ha detectado diferencia alguna en la actividad biológica entre ODN 14 y ODN 1 y ambos presentan una actividad estimulante del sistema inmunitario similar (Mui <i>et al.</i> , 2001)		

5 Raney *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 298:1185-1192 (2001) describe secuencias adicionales de ácidos nucleicos específicos de oligonucleótidos (ODN) adecuadas para ser usadas en las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, los ODN usados en las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria tienen una cadena principal de fosfodiéster ("PO") o una cadena principal de fosforotioato ("PS"), y/o al menos un residuo metilado de citosina en un motivo CpG.

Oligonucleótidos señuelo

10 Dado que los factores de transcripción reconocen sus secuencias de enlace relativamente cortas, aun en ausencia de ADN genómico circundante, los oligonucleótidos cortos que tienen la secuencia de enlace de consenso de un factor específico de transcripción pueden ser usados como herramientas para manipular la expresión génica en células vivas. Esta estrategia implica la administración intracelular de tales "oligonucleótidos señuelo", que son entonces reconocidos por el factor diana, que se enlaza con ellos. La ocupación del sitio de enlace de ADN del factor de transcripción por parte del señuelo vuelve al factor de transcripción incapaz de enlazarse subsiguientemente con las regiones promotoras de genes diana. Los señuelos pueden ser usados como agentes terapéuticos, ya sea para inhibir la expresión de genes que son activados por un factor de transcripción, o para regular al alza genes que son suprimidos por el enlace de un factor de transcripción. Pueden encontrarse ejemplos de la utilización de oligonucleótidos señuelo en Mann *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 2000, 106: 1071-1075.

Supermir

20 Un supermir se refiere a un oligómero o polímero monocatenario, bicatenario o parcialmente bicatenario de ácido ribonucleico (ARN) o ácido dexoxirribonucleico (ADN), o de ambos, o a modificaciones de los mismos, que tiene una secuencia de nucleótidos que es sustancialmente idéntica a un miARN y que es antisentido con respecto a su diana. Este término incluye oligonucleótidos compuestos de nucleobases, azúcares y enlaces internucleósido covalentes (cadena principal) que se dan de forma natural y que contienen al menos una porción que no se da de forma natural que funciona de manera similar. Se prefiere a tales oligonucleótidos modificados o sustituidos sobre las formas nativas debido a propiedades deseables, tales como, por ejemplo, captación celular potenciada, mayor afinidad hacia la diana de ácido nucleico y mayor estabilidad en presencia de nucleasas. En una realización preferente, el supermir no incluye

una cadena sentido, y en otra realización preferente, el supermir no se autohibrida hasta una extensión significativa. Un supermir presentado en la presente memoria puede tener una estructura secundaria, pero es sustancialmente monocatenario en condiciones fisiológicas. Un supermir que sea sustancialmente monocatenario es monocatenario en la medida en que menos de aproximadamente el 50% (por ejemplo, menos de aproximadamente 40%, 30%, 20%, 10% o 5%) del supermir forme un doblete consigo mismo. El supermir puede incluir un segmento —por ejemplo, una secuencia— en horquilla, preferentemente en el extremo 3' y puede autohibridarse y formar una región doble; por ejemplo, una región doble de al menos 1, 2, 3 o 4 y, preferentemente, menos de 8, 7, 6, o n nucleótidos; por ejemplo, 5 nucleótidos. La región duplicada puede estar conectada por un a conector; por ejemplo, un conector nucleotídico —por ejemplo, 3, 4, 5 o 6 dT; por ejemplo, dT modificadas—. En otra realización, el supermir forma un doblete con un oligo más corto —por ejemplo, de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos de longitud—, por ejemplo, en uno o ambos de los extremos 3' y 5' o en un extremo y en la parte no terminal o central del supermir.

Miméticos de miARN

Los miméticos de miARN representan una clase de moléculas que pueden ser usadas para imitar la capacidad de silenciamiento génico de uno o más miARN. Así, la expresión “mimético de microARN” se refiere a ARN sintéticos no codificantes (es decir, el miARN no es obtenido por purificación de una fuente del miARN endógeno) que son capaces de entrar en el sistema de la iARN y de regular la expresión génica. Los miméticos de miARN pueden ser diseñados como moléculas maduras (por ejemplo, monocatenarias) o como precursores miméticos (por ejemplo, pri o pre-miARN). Los miméticos de miARN pueden estar comprendidos por ácido nucleico (ácidos nucleicos modificados o no modificados), incluyendo oligonucleótidos que comprenden, sin limitación, ARN, ARN modificado, ADN, ADN modificado, ácidos nucleicos bloqueados, o ácidos nucleicos con puente de 2'-O,4'-C-etileno (ENA), o cualquier combinación de los anteriores (incluyendo híbridos de ADN-ARN). Además, los miméticos de miARN pueden comprender conjugados que afectan a la distribución, la compartimentalización intracelular, la estabilidad, la especificidad, la funcionalidad, al uso de cadenas y/o a la potencia. En un diseño, los miméticos de miARN son moléculas bicatenarias (por ejemplo, con una región doble entre aproximadamente 16 y aproximadamente 31 nucleótidos en longitud) y contienen una o más secuencias que tienen identidad con la cadena madura de un miARN dado. Las modificaciones pueden comprender modificaciones 2' (incluyendo modificaciones 2'-O-metilo y 2' F) en una o ambas cadenas de la molécula y modificaciones internucleótido (por ejemplo, modificaciones de fosforotioato) que potencian la estabilidad y/o la especificidad del ácido nucleico. Además, los miméticos de miARN pueden incluir protuberancias. Las protuberancias pueden consistir en 1-6 nucleótidos, ya sea en el extremo 3' o en el 5' de cualquiera de las dos cadenas y pueden ser modificados para potenciar la estabilidad o la funcionalidad. En una realización, un mimético de miARN comprende una región doble de entre 16 y 31 nucleótidos y uno o más de los siguientes patrones de modificación química: la cadena sentido contiene modificaciones de 2'-O-metilo de los nucleótidos 1 y 2 (contando desde el extremo 5' del mismo oligonucleótido), y todas las C y los U; las modificaciones de la cadena antisentido pueden comprender la modificación 2' F de todas las C y los U, la fosforilación del extremo 5' del oligonucleótido, y enlaces internucleótido estabilizados asociados con una protuberancia 3' de 2 nucleótidos.

Antimir o inhibidor miARN

Las expresiones “antimir”, “inhibidor de microARN”, “inhibidor miR” o “inhibidor” son sinónimas y se refieren a oligonucleótidos u oligonucleótidos modificados que interfieren en la capacidad de miARN específicos. En general, los inhibidores son ácido nucleico o ácidos nucleicos modificados en naturaleza, incluyendo oligonucleótidos que comprenden ARN, ARN modificado, ADN, ADN modificado, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), o cualquier combinación de los anteriores. Las modificaciones incluyen modificaciones 2' (incluyendo modificaciones 2'-O-alquilo y modificaciones 2' F) y modificaciones internucleótido (por ejemplo, modificaciones de fosforotioato) que pueden afectar a la distribución, la estabilidad, la especificidad, la compartimentalización intracelular o a la potencia. Además, los inhibidores miARN pueden comprender conjugados que pueden afectar a la distribución, la compartimentalización intracelular, la estabilidad y/o a la potencia. Los inhibidores pueden adoptar diversas configuraciones, incluyendo diseños monocatenarios, bicatenarios (dobletes de ARN/ARN o ARN/ADN) y en horquilla; en general, los inhibidores de microARN contienen una o más secuencias o porciones de secuencias que son complementarias o parcialmente complementarias de la cadena o las cadenas maduras del miARN que ha de seleccionarse como diana; además, el inhibidor miARN también puede comprender secuencias adicionales situadas en 5' y 3' con respecto a la secuencia que es el complemento inverso del miARN maduro. Las secuencias adicionales pueden ser los complementos inversos de las secuencias que son adyacentes al miARN maduro en el pri-miARN del que se deriva el miARN maduro, o las secuencias adicionales pueden ser secuencias arbitrarias (que tengan una mezcla de A, G, C o U). En algunas realizaciones, una o ambas de las secuencias adicionales son secuencias arbitrarias capaces de formar horquillas. Así, en algunas realizaciones, la secuencia que es el complemento inverso del miARN está flanqueada por el lado 5' y por el lado 3' por estructuras en horquilla. Los inhibidores de micro-ARN, cuando son bicatenarios, pueden incluir discrepancias entre nucleótidos en las cadenas opuestas. Además, los inhibidores de micro-ARN pueden estar enlazados a restos conjugados para facilitar la captación del inhibidor en una célula. Por ejemplo, un inhibidor de micro-ARN puede enlazarse con colesteril 5-(bis(4-metoxifenil)(fenil)metoxi)-3 hidroxipentilcarbamato, que permite la captación pasiva de un inhibidor de micro-ARN en una célula. Los inhibidores de micro-ARN, incluyendo los inhibidores miARN horquillados, son descritos en detalle en Vermeulen et al., “Double-Stranded Regions Are Essential Design Components Of Potent Inhibitors of RISC Function”, *RNA* 13: 723-730 (2007) y en los documentos WO2007/095387 y WO 2008/036825. Una persona con un dominio normal de la técnica puede seleccionar una secuencia de la base de datos para un miARN deseado y diseñar un inhibidor útil para los métodos dados a conocer en la presente memoria.

Adaptador U1

Los adaptadores U1 inhiben los sitios poliA y son oligonucleótidos bifuncionales con un dominio diana complementario de un sitio en el exón terminal del gen diana y un “dominio U1” que se enlaza con el componente nuclear menor U1 del ARN de la RNPnp U1 (Goraczniak, et al., 2008, *Nature Biotechnology*, 27(3), 257-263). La RNPnp U1 es un complejo ribonucleoproteínico que funciona fundamentalmente dirigiendo las primeras etapas directas en la formación de espliceosoma enlazándose con el límite exón-intrón del pre-ARNm (Brown y Simpson, 1998, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 49:77-95). Los nucleótidos 2-11 del extremo 5' del par de bases del ARNnp U1 con los sitios de empalme 5' del pre ARNm. En una realización, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria son adaptadores U1. En una realización, el adaptador U1 puede ser administrado en combinación con al menos otro agente ARNi.

10 Modificaciones de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos no modificados pueden distar de ser óptimos en algunas aplicaciones; por ejemplo, los oligonucleótidos no modificados pueden ser propensos a degradación, por ejemplo, por las nucleasas celulares. Las nucleasas pueden hidrolizar los enlaces fosfodiéster del ácido nucleico. Sin embargo, modificaciones químicas de los oligonucleótidos pueden conferir propiedades mejoradas y, por ejemplo, pueden hacer los oligonucleótidos más estables a las nucleasas.

Dado que los oligonucleótidos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas a continuación se producen en una posición que se repite dentro de un oligonucleótido; por ejemplo, una modificación de una base, un azúcar, un resto de fosfato, o el oxígeno no puente de un resto de fosfato. No es necesario que todas las posiciones en un oligonucleótido dado sean modificadas de manera uniforme y, des hecho, pueden incorporarse más de una de las modificaciones mencionadas anteriormente en un único oligonucleótido o incluso en un único nucleósido dentro de un oligonucleótido.

En algunos casos, la modificación se producirá en todas las posiciones objeto en el oligonucleótido, pero no en muchos casos, de hecho, en la mayoría. A título de ejemplo, una modificación puede producirse únicamente en una posición del terminal 3' o el 5', puede producirse únicamente en la región interna, puede producirse en una región terminal; por ejemplo, en una posición en un terminal nucleótido o en la últimos 2, 3, 4, 5 o 10 nucleótidos de un oligonucleótido. Una modificación puede producirse en una región bicatenaria, una región monocatenaria o en ambas.

Una modificación puede producirse únicamente en la región bicatenaria de un oligonucleótido bicatenario o puede producirse únicamente en una región monocatenaria de un oligonucleótido bicatenario. Por ejemplo, una modificación de fosforotioato en una posición de oxígeno no puente solo puede producirse en uno o ambos términos, puede producirse únicamente en una región terminal, por ejemplo, en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, o 10 nucleótidos de una cadena, o puede producirse en regiones bicatenarias y monocatenarias, en particular en los terminales. El o los extremos 5' pueden estar fosforilados.

Una modificación descrita en la presente memoria puede ser la única modificación, o el único tipo de modificación incluida en múltiples nucleótidos, o se puede combinar una modificación con una o más modificaciones adicionales descritas en la presente memoria. Las modificaciones descritas en la presente memoria también pueden ser combinadas en un oligonucleótido; por ejemplo, diferentes nucleótidos de un oligonucleótido tienen diferentes modificaciones descritas en la presente memoria.

En algunas realizaciones se prefiere en particular —por ejemplo, para potenciar la estabilidad— incluir nucleobases particulares en protuberancias, o incluir nucleótidos modificados o sucedáneos de nucleótido, en protuberancias monocatenarias; por ejemplo, en una protuberancia 5' o 3', o en ambas. Puede resultar deseable, por ejemplo, incluir nucleótidos de purina en las protuberancias. En algunas realizaciones, todas o algunas de las bases de una protuberancia 3' o 5' serán modificadas, por ejemplo, con una modificación descrita en la presente memoria. Las modificaciones pueden incluir, por ejemplo, el uso de modificaciones en el grupo 2' OH del azúcar ribosa; por ejemplo, el uso de desoxirribonucleótidos —por ejemplo, desoxitimidina— en vez de ribonucleótidos, y modificaciones en el grupo fosfato —por ejemplo, modificaciones de fosfotioato—. No es preciso que las protuberancias sean homólogas con la secuencia diana.

A continuación se describen con mayor detalle modificaciones específicas.

El grupo fosfato

El grupo fosfato es una especie cargada negativamente. La carga es distribuida por igual en los dos átomos de oxígeno no puente. Sin embargo, el grupo fosfato puede ser modificado sustituyendo uno de los oxígenos con un sustituyente diferente. Un resultado de esta modificación a las cadenas principales de fosfato del ARN puede ser la mayor resistencia del oligorribonucleótido a la descomposición nucleolítica. Así, sin desear entrar en consideraciones teóricas, puede resultar deseable en algunas realizaciones introducir alternaciones que den lugar ya sea a un conector no cargado o a un conector cargado con una distribución de carga no simétrica.

Ejemplos de grupos fosfato modificados incluyen fosforotioato, fosforoselenatos, borano fosfatos, ésteres de borano fosfato, fosfonatos ácidos, fosforoamidatos, fosfonatos de alquilo o arilo y fosfortriésteres. En ciertas realizaciones,

uno de los átomos de oxígeno no puente del fosfato en el resto de la cadena principal de fosfato puede ser sustituido por cualquiera de los siguientes: S, Se, BR₃ (R es hidrógeno, alquilo, arilo), C (es decir un grupo alquilo, un grupo arilo, etc...), H, NR₂ (R es hidrógeno, alquilo, arilo), u OR (R es alquilo o arilo). El átomo de fósforo en un grupo fosfato no modificado es aquiral. Sin embargo, la sustitución de uno de los oxígenos no puente con uno de los anteriores átomos o grupos de átomos convierte el átomo fosforoso en quiral; en otras palabras, un átomo fosforoso en un grupo fosfato modificado de esta manera es un centro estereogénico. El átomo fosforoso estereogénico puede poseer ya sea la configuración "R" (aquí Rp) o la configuración "S" (aquí Sp).

Los fosforoditioatos tienen ambos oxígenos no puente sustituidos por azufre. El centro de fósforo en los fosforoditioatos es aquiral, lo que descarta la formación de oligorribonucleótidos diastereómeros. Así, sin desear entrar en consideraciones teóricas, pueden ser deseables modificaciones a ambos oxígenos no puente que eliminen el centro quiral —por ejemplo la formación de fosforoditioato—, porque no pueden producir mezclas de diastereómeros. Así, los oxígenos no puente pueden ser, independientemente, uno cualquiera de S, Se, B, C, H, N u OR (R es alquilo o arilo).

El conector de fosfato también puede ser modificado por la sustitución del oxígeno puente (es decir, el oxígeno que enlaza el fosfato con el nucleósido), con nitrógeno (fosforoamidatos puenteados), azufre (fosfortioatos puenteados) y carbono (metilfosfonatos puenteados). La sustitución puede producirse en uno de los dos oxígenos de enlace o en ambos oxígenos de enlace. Cuando el oxígeno puente es el oxígeno 3' de un nucleósido, se prefiere la sustitución con carbono. Cuando el oxígeno puente es el oxígeno 5' de un nucleósido, se prefiere la sustitución con nitrógeno.

Sustitución del grupo fosfato

El grupo fosfato puede ser sustituido por conectores que no contengan fósforo. Sin desear entrar en consideraciones teóricas, se cree que, dado que el grupo fosfodiéster cargado es el centro de reacción en la degradación nucleolítica, su sustitución con miméticos estructurales neutros debería impartir mayor estabilidad ante la nucleasa. De nuevo, sin desear entrar en consideraciones teóricas, puede resultar deseable, en alguna realización, introducir alternaciones en las que el grupo fosfato cargado sea sustituido por un resto neutro.

Ejemplos de restos que pueden sustituir al grupo fosfato incluyen fosfonato metílico, hidroxilamino, siloxano, carbonato, carboximetilo, carbamato, amida, tioéter, conector de óxido de etileno, sulfonato, sulfonamida, tioformacetal, formacetal, oxima, metilnimino, metilmetilimino, metilhidrazo, metilendimetilhidrazo y metilnoximetilimino. Las sustituciones preferidas incluyen los grupos metilencarbonilamino y metilmetilimino.

Los enlaces fosfato modificados en los que al menos uno de los oxígenos enlazados al fosfato ha sido sustituido o el grupo fosfato ha sido sustituido por un grupo no fosforoso también son denominados "enlace de cadena principal no fosfodiéster".

Sustitución de la cadena principal de ribofosfato

También pueden construirse supercántigos mimetizantes de oligonucleótidos en los que el conector fosfato y el azúcar ribosa son sustituidos por sucedáneos de nucleósido o nucleótido resistentes a la nucleasa. Sin desear entrar en consideraciones teóricas, se cree que la ausencia de una cadena principal cargada de manera repetitiva disminuye el enlace a proteínas que reconocen polianiones (por ejemplo nucleasas). De nuevo, sin desear entrar en consideraciones teóricas, puede resultar deseable en alguna realización introducir alteraciones en las que las bases estén unidas por una cadena principal sucedánea neutra. Ejemplos incluyen los sucedáneos de nucleósido de mofilino, ciclobutilo, pirrolidina y ácido peptidonucleico (APN). Un sucedáneo preferido es un sucedáneo de APN.

Modificaciones de terminales

Los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden ser modificados. Tales modificaciones pueden ser en el extremo 3', en el extremo 5' o en ambos extremos de la molécula. Puede incluir la modificación o la sustitución de un terminal fosfato completo o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido pueden ser conjugados con otras entidades moleculares funcionales, tales como restos de marcado; por ejemplo, fluoróforos (por ejemplo, pireno, TAMRA, fluoresceína, tinciones Cy3 o Cy5) o grupos protectores (a base, por ejemplo, de azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales pueden unirse al azúcar a través de un grupo fosfato y/o un conector. El átomo terminal del conector puede sustituir o conectarse al átomo de enlace del grupo fosfato o al C-3' o C-5' O, N, S o C del grupo del azúcar. Alternativamente, el conector puede sustituir o conectarse al átomo terminal de un sucedáneo de nucleótido (por ejemplo, los APN).

Cuando entre dos cadenas de un ARNbc se interpone una matriz conector/fosfato-entidad molecular funcional-conector/fosfato, esta matriz puede sustituir un bucle de ARN horquillado en un agente de ARN de tipo horquilla.

Modificaciones de terminal útiles para modular la actividad incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. Por ejemplo, en realizaciones preferentes, cadenas antisentido de ARNbc son fosforiladas en 5' o incluyen un análogo de fosforilo en el terminal 5' prima. Las modificaciones de 5'-fosfato incluyen las que son compatibles con un silenciamiento génico arbitrado por RISC. Modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)₂(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)₂(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)₂(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5');

cofia de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); cofia de 5'-adenosina (A_{ppp}), y cualquier estructura de cofia de nucleótido modificada o no modificada (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosfortioato; (HO)₂(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforoditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)₂(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato, difosfato y trifosfatos sustituidos con oxígeno/azufre (por ejemplo 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)₂(O)P-NH-5', (HO)(NH₂)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R=alquilo=metilo etilo, isopropilo, propilo etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5', (OH)₂(O)P-5'-CH₂-), 5'-alquileterfosfonatos (R=alquileter=metoximetilo (MeOCH₂-), etoximetilo etc., por ejemplo RP(OH)(O)-O-5'-).

Las modificaciones de terminal también pueden ser útiles para monitorizar la distribución, y en tales casos los grupos preferidos para ser añadidos incluyen fluoróforos; por ejemplo, fluoresceína o una tinción Alexa —por ejemplo, Alexa 488—. Las modificaciones de terminal también pueden ser útiles para potenciar la captación; las modificaciones útiles para esto incluyen colesterol. Las modificaciones de terminal también pueden ser útiles para reticular un agente de ARN con otro resto; las modificaciones útiles para esto incluyen la mitomicina C.

Nucleobases

La adenina, la guanina, la citosina y el uracilo son las bases más comunes encontradas en el ARN. Estas bases pueden ser modificadas o sustituidas para proporcionar ARN que tengan propiedades mejoradas. Por ejemplo, pueden prepararse oligorribonucleótidos resistentes a la nucleasa con estas bases o con nucleobases sintéticas y naturales (por ejemplo, inosina, timina, xantina, hipoxantina, nubularina, isoguanisina o tubercidine) y una cualquiera de las anteriores modificaciones. Alternativamente, pueden emplearse análogos sustituidos o modificados de cualquiera de las bases anteriores; por ejemplo, "bases inusuales", "bases modificadas", "bases no naturales" y "bases universales" descritas en la presente memoria. Ejemplos incluyen, sin limitación, 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados alquílicos de adenina y guanina, 5-halouracilo y citosina, uracilo 5-propinílico y citosina, 6-azo uracilo, citosina y timina, 5-uracilo (pseudouracilo), 4-tiouracilo, 5-halouracilo, 5-(2-aminopropil)uracilo, uracilo 5-amino alílico, 8-halo, amino, tiol, tioalquilo hidroxilo y otras adeninas y guaninas sustituidas en 8, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas sustituidos en 5, 7-metilguanina, pirimidinas sustituidas en 5, 6-azapirimidinas y purinas sustituidas con N-2, N-6 y O-6, incluyendo 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo y 5-propinilcitosina, dihidrouracilo, 3-deaza-5-azacitosina, 2-aminopurina, 5-alquiluracilo, 7-alquilguanina, citosina 5-alquímica, 7-deazaadenina, N₆, N₆-dimetiladenina, 2,6-diaminopurina, 5-amino-alil-uracilo, N₃-metiluracilo, 1,2,4-triazoles sustituidos, 2-piridinona, 5-nitroindol, 3-nitropirrol, 5-metoxiuracilo, ácido uracil-5-oxiacético, 5-metoxicarbonilmetiluracilo, 5-metil-2-tiouracilo, 5-metoxicarbonilmetil-2-tiouracilo, 5-metilaminometil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-carboxipropil)uracilo, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, citosina N⁴-acetilica, 2-tiocitosina, N₆-metiladenina, N₆-isopentiladenina, 2-metil-2-N₆-isopentiladenina, N-metilguaninas o bases O-alquiladas. Purinas y pirimidinas adicionales incluyen las dadas a conocer en la patente estadounidense n° 3.687.808, las divulgadas en la *Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering*, páginas 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990, y las dadas a conocer en Englisch et al., *Angewandte Chemie*, edición internacional, 1991, 30, 613.

Grupos catiónicos

Las modificaciones a los oligonucleótidos también pueden incluir la unión de uno o más grupos catiónicos al azúcar, la base, y/o al átomo de fósforo de un resto de cadena principal de fosfato o fosfato modificado. Un grupo catiónico puede unirse a cualquier átomo capaz de sustitución en una base natural, inusual o universal. Una posición preferida es una que no interfiera en la hibridación; es decir, que no interfiera en las interacciones de enlace de hidrógeno necesarias para el emparejamiento de bases. Un grupo catiónico puede unirse, por ejemplo, a través de la posición C2' de un azúcar o una posición análoga en un sucedáneo de azúcar cíclico o acíclico. Los grupos catiónicos pueden incluir, por ejemplo, grupos amino protonados, derivados, por ejemplo, de O-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, amino diarílico, amino heteroarílico, o amino diheteroarílico, diamina de etileno, poliamino); aminoalcoxi, por ejemplo, O(CH₂)_nAMINA, (por ejemplo, AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, amino diarílico, amino heteroarílico, o amino diheteroarílico, diamina de etileno, poliamino); amino (por ejemplo NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, amino diarílico, amino heteroarílico, amino, diheteroarílico, o aminoácido); o NH(CH₂CH₂NH)_nCH₂CH₂-AMINA (AMINA = NH₂; alquilamino, dialquilamino, heterociclilo, arilamino, amino diarílico, amino heteroarílico o amino diheteroarílico).

Ubicación dentro de un oligonucleótido

Algunas modificaciones pueden ser incluidas en un oligonucleótido, preferentemente, en una ubicación particular; por ejemplo, en una posición interna de una cadena, o en el extremo 5' o 3' de un oligonucleótido. Una ubicación preferida de una modificación en un oligonucleótido puede conferir propiedades preferidas al agente. Por ejemplo, las ubicaciones preferidas de modificaciones particulares pueden conferir propiedades óptimas de silenciamiento génico, o mayor resistencia a la actividad de la endonucleasa o la exonucleasa.

Uno o más nucleótidos de un oligonucleótido pueden tener un enlace 2'-5'. Uno o más nucleótidos de un oligonucleótido pueden tener enlaces invertidos —por ejemplo enlaces 3'-3', 5'-5', 2'-2' o 2'-3'—.

Un oligonucleótido bicatenario puede incluir al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-UA-3') en el que la uridina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido terminal 5'-uridina-guanina-3' (5'-UG-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido terminal 5'-citidina-adenina-3' (5'-CA-3'), en el que la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido terminal 5'-uridina-uridina-3' (5'-UU-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido terminal 5'-citidina-citidina-3' (5'-CC-3'), en el que la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido terminal 5'-citidina-uridina-3' (5'-CU-3'), en el que la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2', o un dinucleótido terminal 5'-uridina-citidina-3' (5'-UC-3'), en el que la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'. Los oligonucleótidos bicatenarios que incluyen estas modificaciones están particularmente estabilizados con la actividad de la endonucleasa.

10 Referencias generales

Los oligorribonucleótidos y los oligorribonucleósidos usados en la presente memoria pueden ser sintetizados con síntesis en fase sólida; véanse, por ejemplo "Oligonucleotide synthesis, a practical approach", Ed. M. J. Gait, IRL Press, 1984; "Oligonucleotides and Analogues, A Practical Approach", Ed. F. Eckstein, IRL Press, 1991 (especialmente Capítulo 1, Modern machine-aided methods of oligodeoxyribonucleotide synthesis, Capítulo 2, Oligoribonucleotide synthesis, Capítulo 3, 2'-O-Methyloligoribonucleotide-s: synthesis and applications, Capítulo 4, Phosphorothioate oligonucleotides, Capítulo 5, Synthesis of oligonucleotide phosphorodithioates, Capítulo 6, Synthesis of oligo-2'-deoxyribonucleoside methylphosphonates, y Capítulo 7, Oligodeoxynucleotides containing modified bases. Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Beaucage, S. L. e Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2223-2311 y Beaucage, S. L. e Iyer, R. P., *Tetrahedron*, 1993, 49, 6123-6194, o referencias a las que se alude en los mismos, describen otros procedimientos sintéticos particularmente útiles, reactivos, grupos de bloqueo y condiciones de reacción. En la presente memoria puede usarse la modificación descrita en los documentos WO 00/44895, WO01/75164 o WO02/44321.

Referencias del grupo fosfato

La patente estadounidense nº 5.508.270 describe la preparación de oligorribonucleótidos de fosfinato. La patente estadounidense nº 4.469.863 describe la preparación de oligorribonucleótidos de fosfonato alquílico. La patente estadounidense nº 5.256.775 o la patente estadounidense nº 5.366.878 describe la preparación de oligorribonucleótidos de fosforamida. La patente estadounidense nº 5.023.243 describe la preparación de oligorribonucleótidos de fosfotriéster. Las patentes estadounidenses nºs 5.130.302 y 5.177.198 describen la preparación de un oligorribonucleótido de borano fosfato. La patente estadounidense nº 5.476.925 describe la preparación de oligorribonucleótidos de 3'-desoxi-3'-amino fosforamido. Los oligorribonucleótidos de 3'-desoxi-3'-metilfosfonato son descritos en An, H, et al. *J. Org. Chem.* 2001, 66, 2789-2801. La preparación de nucleótidos puenteados con azufre es descrita en Sproat et al. *Nucleosides Nucleotides* 1988, 7, 651 y Crosstick et al. *Tetrahedron Lett.* 1989, 30, 4693.

Referencias del grupo de azúcar

Pueden encontrarse modificaciones a las modificaciones de 2' en Verma, S. et al. *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, 67, 99-134 y en todas las referencias de dicho artículo. Pueden encontrarse modificaciones específicas a la ribosa en las siguientes referencias: 2'-fluoro (Kawasaki et. al., *J. Med. Chem.*, 1993, 36, 831-841), 2'-MOE (Martin, P. *Helv. Chim. Acta* 1996, 79, 1930-1938), "LNA" (Wengel, *J. Acc. Chem. Res.* 1999, 32, 301-310).

Referencias de sustituciones del grupo fosfato

Los oligorribonucleósidos enlazados por metilmetilimino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos enlazados por MMI, los oligorribonucleósidos enlazados por metilendimetilhidrazo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos enlazados por MDH, y los oligonucleósidos enlazados por metilencarbonilamino, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos enlazados por amida-3, y los oligonucleósidos enlazados por metilaminocarbonilo, también identificados en la presente memoria como oligorribonucleósidos enlazados por amida-4, así como compuestos de cadena principal mixta que tienen, por ejemplo, enlaces alternantes MMI y PO o PS, pueden prepararse según se describe en las patentes estadounidenses nºs 5.378.825, 5.386.023, 5.489.677 y en las solicitudes de PCT publicadas PCT/US92/04294 y PCT/US92/04305 (publicadas como WO 92/20822 y WO 92/20823, respectivamente). Los oligorribonucleósidos enlazados por formacetal y tioformacetal pueden ser preparados según se describe en las patentes estadounidenses nºs 5.264.562 y 5.264.564. Los oligorribonucleósidos enlazados por óxido de etileno pueden ser preparados según se describe en la patente estadounidense nº 5.223.618. Se describen sustituciones de siloxano en Cormier, J.F. et al. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4583. Se describen sustituciones de carbonato en Tittensor, J.R. *J. Chem. Soc. C* 1971, 1933. Se describen sustituciones de carboximetilo en Edge, M.D. et al. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1972, 1991. Se describen sustituciones de carbamato en Storchak, E.P. *Nucleic Acids Res.* 1989, 17, 6129.

55 Referencias de sustituciones de la cadena principal de fosfato-ribosa

Los compuestos sucedáneos de azúcar ciclobutilo pueden ser preparados según se describe en la patente estadounidense nº 5.359.044. El sucedáneo de azúcar pirrolidina puede ser preparado según se describe en la patente estadounidense nº 5.519.134. Los sucedáneos de azúcar morfolino pueden ser preparados según se describe en las

patentes estadounidenses n^{os} 5.142.047 y 5.235.033, y en otras divulgaciones de patentes relacionadas. Los ácidos peptidonucleicos (APN) son conocidos por derecho propio y pueden ser preparados según cualquiera de los diversos procedimientos a los que se hace referencia en *Peptide Nucleic Acids (PNA): Synthesis, Properties and Potential Applications, Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 1996, 4, 5-23. También pueden ser preparados según la patente estadounidense n^o 5.539.083.

Referencias a las modificaciones de terminales

Las modificaciones de terminales se describen en Manoharan, M. et al. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 12, 103-128 (2002) y en las referencias de dicho artículo.

Referencias de nucleobases

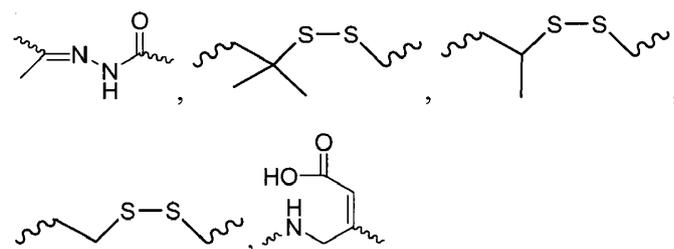
Las amiditas de nucleósido de purina sustituidas en N-2 pueden prepararse según se describe en la patente estadounidense n^o 5.459.255. Se pueden preparar amiditas de nucleósido de 3-deaza purina según se describe en la patente estadounidense n^o 5,457,191. Se pueden preparar amiditas de nucleósido de pirimidina sustituida en 5,6 según se describe en la patente estadounidense n^o 5.614.617. Pueden prepararse amiditas de nucleósido de pirimidina 5-propinílica según se describe en la patente estadounidense n^o 5.484.908.

15 Conectores

El término "conector" significa un resto orgánico que conecta dos partes de un compuesto. Los conectores normalmente comprenden un enlace directo o un átomo como oxígeno o azufre, una unidad tal como NR¹, C(O), C(O)NH, SO, SO₂, SO₂NH o una cadena de átomos, tales como alquilo sustituido o insustituido, alquenilo sustituido o insustituido, alquinilo sustituido o insustituido, arilalquilo, arilalquenilo, arilalquinilo, heteroarilalquilo, heteroarilalquenilo, heteroarilalquinilo, heterociclilalquilo, heterociclilalquenilo, heterociclilalquinilo, arilo, heteroarilo, heterociclilo, cicloalquilo, cicloalquenilo, alquilarilalquilo, alquilarilalquenilo, alquilarilalquinilo, alquenilarilalquilo, alquenilarilalquenilo, alquenilarilalquinilo, alquinilarilalquilo, alquinilarilalquenilo, alquinilarilalquinilo, alquilheteroarilalquilo, alquilheteroarilalquenilo, alquilheteroarilalquinilo, alquenilheteroarilalquilo, alquenilheteroarilalquenilo, alquenilheteroarilalquinilo, alquilheterociclilalquilo, alquilheterociclilalquenilo, alquilheterociclilalquinilo, alquenilheterociclilalquilo, alquenilheterociclilalquenilo, alquenilheterociclilalquinilo, alquinilheterociclilalquilo, alquinilheterociclilalquenilo, alquinilheterociclilalquinilo, alquilarilo, alquenilarilo, alquinilarilo, alquilheteroarilo, alquenilheteroarilo, alquinilheteroarilo, en los que uno o más metilenos pueden ser interrumpidos o terminados por O, S, S(O), SO₂, N(R¹)₂, C(O), un grupos de conectores escindibles, arilo sustituido o insustituido, heteroarilo sustituido o insustituido, heterociclo sustituido o insustituido; siendo R¹ hidrógeno, acilo, alifático o alifático sustituido.

En una realización, el conector es $-(P-Q-R)_q-X-(P'-Q'-R')_q-T-$, en el que:

P, R, T, P', R' y T son cada uno, independientemente para cada incidencia, ausente, CO, NH, O, S, OC(O), NHC(O), CH₂, CH₂NH, CH₂O; NHCH(R^a)C(O), -C(O)-CH(R^a)-NH-, CH=N-O,



o heterociclilo;

Q y Q' son cada uno, independientemente para cada incidencia, ausente, $-(CH_2)_n-$, $-C(R^1)(R^2)(CH_2)_n-$, $-(CH_2)_nC(R^1)(R^2)-$, $-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2-$, o $-(CH_2CH_2O)_mCH_2CH_2NH-$;

X está ausente o es un conector de grupos escindibles;

R^a es H o una cadena lateral de aminoácido;

R¹ y R² son cada uno, independientemente, para cada incidencia, H, CH₃, OH, SH o N(R^N)₂;

R^N es, independientemente para cada incidencia, H, metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo o bencilo;

q, q' y q'' son cada uno, independientemente, para cada incidencia, 0-20 y en los que la unidad de repetición puede ser la misma o diferente;

n es, independientemente para cada incidencia, 1-20; y

m es, independientemente para cada incidencia, 0-50.

En una realización, el conector comprende al menos un grupo de conectores de escindibles.

En ciertas realizaciones, el conector es un conector ramificado. El punto de ramificación del conector ramificado puede ser al menos trivalente, pero puede ser un átomo tetravalente, pentavalente o hexavalente, o un grupo que presente

tales valencias múltiples. En ciertas realizaciones, el punto de ramificación es -N, -N(Q)-C, -O-C, -S-C, -SS-C, -C(O)N(Q)-C, -OC(O)N(Q)-C, -N(Q)C(O)-C, o -N(Q)C(O)O-C; siendo Q, independientemente para cada incidencia, H o alquilo opcionalmente sustituido. En otras realizaciones, el punto de ramificación es glicerol o un derivado de glicerol.

Grupos conectores escindibles

5 Un grupo conector escindible es aquel que es suficientemente estable fuera de la célula, pero que, tras su entrada en una célula diana, es escindido para liberar las dos partes que el conector mantiene unidas. En una realización preferente, el grupo conector escindible es escindido al menos 10 veces o más, preferentemente al menos 100 veces más rápido en la célula diana o bajo una primera condición de referencia (que puede ser seleccionada, por ejemplo, para imitar o representar condiciones intracelulares) que en la sangre de un sujeto, o bajo una segunda condición de referencia (que puede ser seleccionada, por ejemplo, para imitar o representar condiciones encontradas en la sangre o el suero).

15 Los grupos conectores escindibles son susceptibles a los agentes de escisión; por ejemplo, el pH, potencial redox o la presencia de moléculas degradadoras. Generalmente, los agentes de escisión son más frecuentes o se encuentran a niveles o con actividades mayores dentro de las células que en el suero o la sangre. Ejemplos de tales agentes degradadores incluyen: agentes redox que son seleccionados en busca de sustratos particulares o que no tengan ninguna especificidad de sustrato, incluyendo, por ejemplo, enzimas oxidativas o reductoras o agentes reductores tales como mercaptanos, presentes en las células, que pueden degradar un grupo conector redox escindible por reducción; esterasas; endosomas o agentes que puedan crear un entorno ácido —por ejemplo, los que dan lugar a un pH de cinco o menor—; enzimas que puedan hidrolizar o degradar un grupo conector ácido escindible actuando como un ácido general, peptidasas (que pueden ser específicas al sustrato) y fosfatasas.

20 Un grupo de enlace escindible, tal como un enlace disulfuro, puede ser susceptible al pH. El pH del suero humano es 7,4, mientras que el pH intracelular promedio es ligeramente menor, oscilando en torno a 7,1-7,3. Los endosomas tienen un pH más ácido, en el intervalo de 5,5-6,0, y los lisosomas tienen un pH aún más ácido, en torno a 5,0. Algunos conectores tendrán un grupo conector escindible que se escinda a un pH preferido, liberando con ello el lípido catiónico del ligando dentro de la célula, o al compartimento deseado de la célula.

25 Un conector puede incluir un grupo conector escindible que es escindible por una enzima particular. El tipo de grupo conector escindible incorporado en un conector puede depender de la célula seleccionada como diana. Por ejemplo, los ligandos que seleccionan como diana el hígado pueden enlazarse a los lípidos catiónicos a través de un conector que incluye un grupo éster. Los hepatocitos son ricos en esterasas, y, por lo tanto, el conector se escindirán más eficazmente en los hepatocitos que en tipos de células que no son ricas en esterasas. Otros tipos celulares ricos en esterasas incluyen las células del pulmón, de la corteza renal y del testículo.

Los conectores que contienen enlaces peptídicos pueden ser usados cuando se selecciona como diana a tipos de células ricas en peptidasas, tales como hepatocitos y sinoviocitos.

35 En general, la adecuación de un grupo conector escindible candidato puede ser evaluada sometiendo a ensayo la capacidad de un agente (o condición) degradador de escindir el grupo conector candidato. También será deseable someter a ensayo al grupo conector escindible candidato en cuanto a su capacidad de resistir su escisión en la sangre o cuando está en contacto con otro tejido no diana. Así, se puede determinar la susceptibilidad relativa a la escisión entre una primera condición y una segunda, seleccionándose la primera para que sea indicativa de escisión en una célula diana y seleccionándose la segunda para que sea indicativa de escisión en otros tejidos o fluidos biológicos —por ejemplo, sangre o suero—. Las evaluaciones pueden llevarse a cabo en sistemas libres de células, en células, en cultivo celular, en cultivo en un órgano o un tejido, o en animales completos. Puede ser útil realizar evaluaciones iniciales en condiciones de cultivo o libres de células, y confirmarlas mediante evaluaciones posteriores en animales completos. En realizaciones preferentes, los compuestos candidatos útiles se escinden al menos 2, 4, 10 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) que en sangre o suero (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones extracelulares).

Grupos conectores redox escindibles

Una clase de grupos conectores escindibles son los grupos conectores redox escindibles, que se escinden tras la reducción o la oxidación. Un ejemplo de grupo conector escindible reductivamente es un grupo conector disulfuro (-S-S-). Para determinar si un grupo conector escindible candidato es un "grupo conector escindible reductivamente" adecuado, o, por ejemplo, es adecuado para su uso con un resto ARNi particular y un agente de acceso particular, se puede recurrir a métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, un candidato puede ser evaluado mediante incubación con ditioneitol (DTT), u otro agente reductor usando reactivos conocidos en la técnica, que imitan la tasa de escisión que se observaría en una célula; por ejemplo, una célula diana. Los candidatos también pueden ser evaluados en condiciones que se seleccionan para imitar las condiciones de la sangre o el suero. En una realización preferente, los compuestos candidatos son escindidos, como máximo, un 10% en la sangre. En realizaciones preferentes, los compuestos candidatos útiles se degradan al menos 2, 4, 10 o 100 veces más rápido en la célula (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones intracelulares) que en sangre (o en condiciones *in vitro* seleccionadas para imitar condiciones extracelulares). La tasa de escisión de los compuestos candidatos puede

determinarse usando ensayos cinéticos enzimáticos estándar en condiciones escogidas para imitar medios intracelulares y comparara con condiciones escogidas para imitar medios extracelulares.

Grupos conectores escindibles a base de fosfato

5 Los grupos conectores escindibles a base de fosfato son escindidos por agentes que degradan o hidrolizan el grupo fosfato. Un ejemplo de agente que escinde grupos fosfato en células son enzimas tales como las fosfatasas en las células. Ejemplos de grupos conectores a base de fosfato son -O-P(O)(ORk)-O-, -O-P(S)(ORk)-O-, -O-P(S)(SRk)-O-, -S-P(O)(ORk)-O-, -O-P(O)(ORk)-S-, -S-P(O)(ORk)-S-, -O-P(S)(ORk)-S-, -S-P(S)(ORk)-O-, -O-P(O)(Rk)-O-, -O-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-O-, -S-P(S)(Rk)-O-, -S-P(O)(Rk)-S-, -O-P(S)(Rk)-S-. Realizaciones preferentes son -O-P(O)(OH)-O-, -O-P(S)(OH)-O-, -O-P(S)(SH)-O-, -S-P(O)(OH)-O-, -O-P(O)(OH)-S-, -S-P(O)(OH)-S-, -O-P(S)(OH)-S-, -S-P(S)(OH)-O-, -O-P(O)(H)-O-, -O-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-O-, -S-P(S)(H)-O-, -S-P(O)(H)-S-, -O-P(S)(H)-S-. Una realización preferente es -O-P(O)(OH)-O-. Estos candidatos pueden ser evaluados usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

Grupos conectores ácidos escindibles

15 Los grupos conectores ácidos escindibles son grupos conectores que se escinden en condiciones ácidas. En realizaciones preferentes, los grupos conectores ácidos escindibles se escinden en un entorno ácido con un pH de aproximadamente 6,5 o menor (por ejemplo, aproximadamente 6,0, 5,5, 5,0 o menor), o por agentes tales como enzimas que pueden actuar como un ácido general. En una célula, orgánulos específicos de bajo pH, como los endosomas y los lisosomas, pueden proporcionar un entorno de escisión para grupos conectores ácidos escindibles. Ejemplos de grupos conectores ácidos escindibles incluyen, sin limitación, hidrazonas, ésteres, y ésteres de aminoácidos. Los grupos ácidos escindibles pueden tener la fórmula general -C=NN-, C(O)O, u -OC(O). Una realización preferente es cuando el carbono unido al oxígeno del éster (el grupo alcoxi) es un grupo arilo, un grupo alquilo sustituido o un grupo alquilo terciario, tal como dimetilo, pentilo o t-butilo. Estos candidatos pueden ser evaluados usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

Grupos conectores a base de ésteres

25 Los grupos conectores escindibles a base de ésteres son escindidos por enzimas como las estererasas y lasamidases en las células. Ejemplos de grupos conectores escindibles a base de ésteres incluyen, sin limitación, ésteres de grupos alqueno, alquilenilo y alquinileno. Los grupos conectores de ésteres escindibles tienen la fórmula general -C(O)O- u -OC(O)-. Estos candidatos pueden ser evaluados usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

Grupos de escisión a base de péptidos

30 Los grupos conectores escindibles a base de péptidos son escindidos por enzimas como las peptidasas y las proteasas en las células. Los grupos conectores escindibles a base de péptidos son enlaces peptídicos formados entre aminoácidos para producir oligopéptidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos etc.) y polipéptidos. Los grupos escindibles a base de péptidos no incluyen el grupo amida (-C(O)NH-). El grupo amida puede formarse entre cualquier alqueno, alquilenilo o alquinileno. Un enlace peptídico es un tipo especial de enlace amídico formado entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas. El grupo escindible a base de péptidos está generalmente limitado al enlace peptídico (es decir, el enlace amídico) formado entre aminoácidos para producir péptidos y proteínas y no incluye todo el grupo funcional amida. Los grupos conectores escindibles a base de péptidos tienen la fórmula general -NHCHR^AC(O)NHCHR^BC(O)-, en la que R^A y R^B son los grupos R de los dos aminoácidos adyacentes. Estos candidatos pueden ser evaluados usando métodos análogos a los descritos anteriormente.

40 **Ligandos**

Una amplia variedad de entidades puede aplicarse a los oligonucleótidos y los lípidos descritos en la presente memoria. Restos preferidos son los ligandos, que están acoplados, preferentemente de manera covalente, ya sea directa o indirectamente, a través de un enlace intermedio.

45 En realizaciones preferentes, un ligando altera la distribución, la capacidad de acceso o el tiempo de vida de la molécula en la que se incorpora. En realizaciones preferentes, un ligando proporciona una mayor afinidad hacia una diana seleccionada —por ejemplo, molécula, célula o tipo de célula—, un compartimento —por ejemplo, un compartimento celular o de órgano—, un tejido, un órgano o una zona del cuerpo, en comparación, por ejemplo, con una especie que carezca de tal ligando. Los ligandos que proporcionan mayor afinidad hacia una diana seleccionada también son denominados ligandos de acceso. Los ligandos preferidos para su conjugación con los lípidos de la presente invención son los ligandos de acceso.

55 Algunos ligandos pueden tener propiedades endosomolíticas. Los ligandos endosomolíticos promueven la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición descrita en la presente memoria, o de sus componentes, desde el endosoma al citoplasma de la célula. El ligando endosomolítico puede ser un péptido o peptidomimético polianiónico que presente actividad membranal dependiente del pH y fusogenicidad. En ciertas realizaciones, el ligando endosomolítico asume su conformación activa al pH endosomal. La conformación “activa” es aquella conformación en la que el ligando endosomolítico promueve la lisis del endosoma y/o el transporte de la composición descrita en la

5 presente memoria, o de sus componentes, del endosoma al citoplasma de la célula. Ligandos endosomolíticos ejemplares incluyen el péptido GALA (Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972), el péptido EALA (Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586) y sus derivados (Turk et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 2002, 1559: 56-68). En ciertas realizaciones, el componente endosomolítico puede contener un grupo químico (por ejemplo, un aminoácido) que experimentará un cambio en la carga o la protonación en respuesta a un cambio en el pH. El componente endosomolítico puede ser lineal o ramificado. La Tabla 5 muestra secuencias primarias ejemplares de ligandos endosomolíticos a base de péptidos.

Tabla 5: Lista de péptidos con actividad endosomolítica.

Nombre	Secuencia (N a C)	Ref.
GALA	AALEALAEALAEALAEALAEAAAAGGC	1
EALA	AALAEALAEALAEALAEALAEALAAAAGGC	2
	ALEALAEALAEALAEALAE	3
INF-7	GLFEAIEGFIENGWEGMIWDYG	4
Inf HA-2	GLFGAIAGFIENGWEGMIDGWYG	5
diiNF-7	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	5
	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGWYGC	
diiNF3	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	6
	GLF EAI EGFI ENGW EGMI DGGC	
GLF	GLFGALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAAAGGSC	6
GALA-INF3	GLFEAIEGFIENGWEGLAELAEALAEALAAAGGSC	5
INF-5	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG K	4
	GLF EAI EGFI ENGW EGnI DG	

n, norleucina

10 **Referencias**

1. Subbarao et al., *Biochemistry*, 1987, 26: 2964-2972.
2. Vogel et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118: 1581-1586
3. Turk, M. J., Reddy, J. A. et al. (2002). Characterization of a novel pH-sensitive peptide that enhances drug release from folate-targeted liposomes at endosomal pHs. *Biochim. Biophys. Acta* 1559, 56-68.
- 15 4. Plank, C. Oberhauser, B. Mechtler, K. Koch, C. Wagner, E. (1994). The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems, *J. Biol. Chem.* 269 12918-12924.
5. Mastrobattista, E., Koning, G. A. et al. (2002). Functional characterization of an endosome-disruptive peptide and its application in cytosolic delivery of immunoliposome-entrapped proteins. *J. Biol. Chem.* 277, 27135-43.
- 20 6. Oberhauser, B., Plank, C. et al. (1995). Enhancing endosomal exit of nucleic acids using pH-sensitive viral fusion peptides. *Deliv. Strategies Antisense Oligonucleotide Ther.* 247-66.

Los ligandos preferidos pueden mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad y también pueden potenciar la resistencia a la nucleasa por parte del oligorribonucleótido natural o modificado resultante, o de una molécula que comprenda cualquier combinación de monómeros descritos en la presente memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

25 Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos —por ejemplo, para potenciar la captación—; compuestos diagnósticos o grupos indicadores —por ejemplo, para monitorizar la distribución—; agentes reticulantes; y restos que confieren resistencia a la nucleasa. Ejemplos generales incluyen lípidos, esteroides, vitaminas, azúcares, proteínas, péptidos, poliaminas y peptidomiméticos.

30 Los ligandos pueden incluir una sustancia que se dé de forma natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA), lipoproteína de baja densidad (LDL), lipoproteína de alta densidad (HDL), o globulina); un hidrato de carbono (por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosán, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico); o un lípido. El ligando también puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético —por ejemplo, un poliaminoácido sintético—, un oligonucleótido (por ejemplo un aptámero). Ejemplos de poliaminoácidos incluyen aquellos en los que el poliaminoácido es polilisina (PLL), ácido poli L-aspártico, ácido poli L-glutámico, copolímero anhídrido de ácido estireno-maleico, copolímero de poli (L-lactida-co-glicólido), copolímero de éter divinílico-anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), alcohol polivinílico (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrílico), polímeros de N-isopropilacrilamida o polifosfacina. Ejemplos

de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrímica, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina o un péptido alfa helicoidal.

5 Los ligandos también pueden incluir grupos de acceso; por ejemplo, un agente que seleccione como diana una célula o un tejido; por ejemplo, una lectina, una glicoproteína, un lípido o una proteína; por ejemplo, un anticuerpo que se enlace con un tipo de célula especificado, tal como una célula renal. Un grupo de acceso puede ser tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína surfactante A, el hidrato de carbono mucina, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente, poliaminoácidos glicosilados, galactosa multivalente, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, un lípido, colesterol, un esteroide, ácido biliar, folato, vitamina B12, biotina, un péptido RGD, un peptidomimético RGD o un aptámero. La Tabla 6 muestra algunos ejemplos de ligandos de acceso y sus receptores asociados.

Tabla 6: Ligandos de acceso y sus receptores asociados

Hepatocitos	Ligando	Receptor
1) Célula parenquimal (PC) (Hepatocitos)	Galactosa	ASGP-R (receptor asialoglicoproteína)
	Gal NAc (n-acetil-galactosamina)	Receptor ASPG-R Gal NAc
	Lactosa	
	Asialofetuina	ASPG-r
2) Célula endotelial sinusoidal (SEC)	Hialuronano	Receptor de hialuronano
	Procolágeno	Receptor de procolágeno
	Moléculas cargadas negativamente	Receptores neutralizadores
	Manosa	Receptor de manosa
	Glucosamina N-acetífica	Receptores neutralizadores
	Inmunoglobulinas	Receptor Fc
	LPS	Receptor CD14
	Insulina	Transcitosis arbitrada por receptor
	Transferrina	Transcitosis arbitrada por receptor
	Albúminas	Inespecífico
	Conjugados de azúcar-albúmina	
3) Célula de Kupffer (KC)	Manosa	Receptores de manosa
	Fucosa	Receptores de fucosa
	Albúminas	Inespecífico
	Conjugados manosa-albúmina	

15 Otros ejemplos de ligandos incluyen tinciones, agentes intercalantes (por ejemplo, acridinas), reticulantes (por ejemplo, psoraleno, mitomicina C), porfirinas (TPPC4, texafirina, zafirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (por ejemplo, fenacina, dihidrofenacina), endonucleasas artificiales (por ejemplo, EDTA), moléculas lipófilas —por ejemplo, colesterol—, ácido cólico, ácido acético adamantano, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleil)litolcólico, ácido O3-(oleil)colénico, dimetoxitritilo o fenoxacina) y conjugados de péptidos (por ejemplo, péptido Antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (por ejemplo, PEG-40K), MPEG, [MPEG]₂, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores de radiomarcado, enzimas, haptenos (por ejemplo, biotina), facilitadores del transporte/la absorción (por ejemplo,

aspirina, vitamina E, ácido fólico), ribonucleasas sintéticas (por ejemplo, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos Eu³⁺ de tetraazamacrociclos), dinitrofenilo, HRP o AP.

5 Los ligandos pueden ser proteínas —por ejemplo, glicoproteínas—, o péptidos —por ejemplo, moléculas que tengan una afinidad específica hacia un co-ligando—, o anticuerpos —por ejemplo, un anticuerpo que se enlace con un tipo de célula especificado, tal como una célula cancerosa, una célula endotelial o una célula ósea. Los ligandos también pueden incluir hormonas y receptores hormonales. También pueden incluir especies no peptídicas, tales como lípidos, lectinas, hidratos de carbono, vitaminas, cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, fucosa multivalente o aptámeros. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la p38 MAP quinasa o un activador de NF-κB.

10 El ligando puede ser una sustancia —por ejemplo, un fármaco— que pueda aumentar la captación del agente ARNi en la célula —por ejemplo, trastocando el citoesqueleto de la célula; por ejemplo, trastocando los microtúbulos, los microfilamentos y/o los filamentos intermedios de la célula—. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxón, vincristina, vinblastina, citocalasina, nocodazol, jlaplaquinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina o mioservina.

15 El ligando puede aumentar la captación del agente ARNi en la célula activando, por ejemplo, una respuesta inflamatoria. Ligandos ejemplares que tendrían tal efecto incluyen el factor de necrosis tumoral alfa (TNFalfa), la interleucina-1 beta o el interferón gamma.

20 En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula a base de lípido. Tal lípido o tal molécula a base de lípido se enlaza, preferentemente, con una proteína sérica; por ejemplo, albúmina sérica humana (HSA). Un ligando de enlace con la HSA permite la distribución del conjugado a un tejido diana; por ejemplo, un tejido diana no renal del cuerpo. Por ejemplo, el tejido diana puede ser el hígado, incluyendo las células parenquimales del hígado. También pueden usarse como ligandos otras moléculas que pueden enlazarse con la HSA. Por ejemplo, pueden usarse neproxina o aspirina. Un lípido o un ligando a base de lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar la capacidad de acceso o el transporte a una célula diana o a una membrana celular, y/o (c) puede ser usado para ajustar el enlace con una proteína sérica; por ejemplo, HSA.

25 Un ligando a base de lípido puede ser usado para modular —por ejemplo, controlar— el enlace del conjugado con un tejido diana. Por ejemplo, un lípido o un ligando a base de lípido que se enlace con la HSA con más fuerza será menos probable que sea dirigido al riñón y, por lo tanto, menos probable que se eliminado del cuerpo. Un lípido o un ligando a base de lípido que se enlaza como la HSA con menos fuerza puede ser usado para dirigir el conjugado al riñón.

30 En una realización preferente, el ligando a base de lípido se enlaza con la HSA. Preferentemente, se enlaza con la HSA con una afinidad suficiente para que el conjugado se distribuya preferentemente a un tejido no renal. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que el enlace HSA-ligando no pueda invertirse.

En otra realización preferente, el ligando a base de lípido se enlaza con la HSA de forma débil o no lo hace en absoluto, para que el conjugado se distribuya preferentemente al riñón. También pueden usarse otros restos que seleccionen como dianas células renales en lugar del ligando a base de lípido o además del mismo.

35 En otro aspecto, el ligando es un resto —por ejemplo, una vitamina—, que es captado por una célula diana —por ejemplo, una célula proliferativa—. Estos son particularmente útiles para tratar trastornos caracterizados por una proliferación celular no deseada —por ejemplo, de tipo maligno o no maligno; por ejemplo, células cancerosas—. Vitaminas ejemplares incluyen las vitaminas A, E y K. Otras vitaminas ejemplares incluyen la vitamina B; por ejemplo, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes captados por las células cancerosas. También se incluyen la HAS, la lipoproteína de baja densidad (LDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL).

40 En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferentemente un agente helicoidal de permeación celular. Preferentemente, el agente es anfipático. Un agente ejemplar es un péptido tal como tat o antennopedia. Si el agente es un péptido, puede ser modificado, incluyendo un peptidilmimético, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos, y el uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es, preferentemente, un agente alfa-helicoidal, que preferentemente tiene una fase lipófila y una lipófoba.

45 El ligando puede ser un péptido o un peptidomimético. Un peptidomimético (también denominado en la presente memoria oligopeptidomimético) es una molécula capaz de plegarse en una estructura tridimensional definida similar a un péptido natural. El resto peptídico o peptidomimético puede ser de aproximadamente 5-50 aminoácidos de longitud; por ejemplo, de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos de longitud (véase, por ejemplo, la Tabla 7).

Tabla 7. Péptidos ejemplares de permeación celular

	Secuencia de aminoácidos	Referencia
Penetratina	RQIKIWFQNRMRMKWKK	Derossi et al., <i>J. Biol. Chem.</i> 269:10444, 1994

	Secuencia de aminoácidos	Referencia
Fragmento Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQC	Vives et al., <i>J. Biol. Chem.</i> , 272:16010, 1997
Péptido basado en secuencias señal	GALFLGWLGAAGSTMGAWSQPKKKR KV	Chaloin et al., <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , 243:601, 1998
PVEC	LLIILRRRIRKQAHHSK	Elmqvist et al., <i>Exp. Cell Res.</i> , 269:237, 2001
Transportan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	Pooga et al., <i>FASEB J.</i> , 12:67, 1998
Péptido anfifílico modelo	KLALKLALKALKALKLA	Oehlke et al., <i>Mol. Ther.</i> , 2:339, 2000
Arg ₉	RRRRRRRR	Mitchell et al., <i>J. Pept. Res.</i> , 56:318, 2000
Permeación de la pared celular bacteriana	KFFKFFKFFK	
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFL RNLVPRTE	
Cecropina P1	SWLSKTAKKLENSAKKRISGIAIAIQG GPR	
α -defensina	ACYCRIPACIAGERRYGTCTIYQGRLLWA FCC	
β -defensina	DHYNCVSSGGQCLYSACPIFTKIQGTCT YRGKAKCKK	
Bactenecina	RKCRIVVIRVCR	
PR-39	RRRPRPPYLPRPRPPFFPRLPPRIPPGF PPRFPPRFPGR-NH ₂	
Indolicidina	ILPWKWPWWPWRR-NH ₂	

Un péptido o peptidomimético puede ser, por ejemplo, un péptido de permeación celular, un péptido restringido o un péptido reticulado. En otra alternativa, el resto de péptido puede incluir una secuencia de translocación membranal (MTS) hidrófoba. Un péptido ejemplar que contiene una MTS hidrófoba es el RFGF, que tiene la secuencia de aminoácidos AAVALLPAVLLALLAP. También puede ser un resto de acceso un análogo de RFGF (por ejemplo, la secuencia de aminoácidos AALLPVLLAAP) que contiene una MTS hidrófoba. El resto peptídico puede ser un péptido de “administración”, que puede transportar grandes moléculas polares, incluyendo péptidos, oligonucleótidos y proteínas—a través de las membranas celulares. Por ejemplo, se ha descubierto que secuencias de la proteína Tat (GRKKRRQRRRPPQ) del VIH y la proteína Antennapedia (RQIKIWFQNRRMKWKK) de la *Drosophila* son capaces de actuar como péptidos de administración. Un péptido o peptidomimético puede estar codificado por una secuencia aleatoria de ADN, tal como un péptido identificado a partir de una biblioteca de visualización de fagos, o de una biblioteca combinatoria de un solo compuesto por soporte (OBOC) (Lam et al., *Nature*, 354:82-84, 1991). Preferentemente, el péptido o peptidomimético enlazado a un agente ARNi mediante una unidad monomérica incorporada es un péptido de acceso celular, tal como un péptido de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD) o un mimético de RGD. Un resto peptídico puede oscilar en longitud entre aproximadamente 5 aminoácidos y aproximadamente 40 aminoácidos. Los restos peptídicos pueden tener una modificación estructural, tal como para aumentar su estabilidad o dirigir las propiedades conformacionales. Pueden utilizarse cualesquiera de las modificaciones estructurales descritas a continuación.

Puede usarse un resto peptídico RGD para seleccionar como diana una célula tumoral, tal como una célula tumoral endotelial o una célula tumoral de cáncer de mama (Zitzmann et al., *Cancer Res.*, 62:5139-43, 2002). Un péptido RGD puede facilitar el direccionamiento de un agente ARNi a tumores de diversos tejidos adicionales, incluyendo el pulmón, el riñón, el bazo o el hígado (Aoki et al., *Cancer Gene Therapy* 8:783-787, 2001). Preferentemente, el péptido RGD facilitará el direccionamiento de un agente ARNi al riñón. El péptido RGD puede ser lineal o cíclico, y puede estar modificado—por ejemplo, glicosilado o metilado— para facilitar su direccionamiento a tejidos específicos. Por ejemplo, un péptido RGD glicosilado puede administrar un agente ARNi a una célula tumoral que exprese $\alpha_v\beta_3$ (Haubner et al., *Jour. Nucl. Med.*, 42:326-336, 2001).

Pueden usarse péptidos que seleccionen como diana marcadores enriquecidos en células proliferativas. Por ejemplo, los péptidos y peptidomiméticos que contienen RGD pueden seleccionar como diana células cancerosas, en particular células que presentan una integrina $\alpha_v\beta_3$. Así, se podrían usar péptidos RGD, péptidos cíclicos que contengan RGD, péptidos RGD que incluyan D-aminoácidos, así como miméticos sintéticos de RGD. Además del RGD, se pueden usar otros restos que seleccionan como diana el ligando de integrina $\alpha_v\beta_3$. Generalmente, se pueden usar tales ligandos para controlar las células proliferativas y la angiogénesis. Conjugados preferentes de este tipo son los ligandos que

seleccionan como diana PECAM-1, VEGF otro gen de cáncer; por ejemplo, un gen de cáncer descrito en la presente memoria.

Un "péptido de permeación celular" es capaz de permear una célula —por ejemplo, una célula microbiana, tal como una célula bacteriana o fúngica, o una célula de mamífero, tal como una célula humana—. Un péptido de permeación de una célula microbiana puede ser, por ejemplo, un péptido lineal α -helicoidal (por ejemplo, LL-37 o Cecropina PI), un péptido que contenga un enlace disulfuro (por ejemplo, α -defensina, β -defensina o bactenecina), o un péptido que contenga únicamente uno o dos aminoácidos dominantes (por ejemplo, PR-39 o indolicidina). Un péptido de permeación celular también puede incluir una señal de localización nuclear (NLS). Por ejemplo, un péptido de permeación celular puede ser un péptido anfipático bipartito, tal como MPG, que se deriva de un dominio peptídico de fusión de gp41 del VIH-1 y la NLS del antígeno T grande del SV40 (Simeoni et al., *Nucl. Acids Res.* 31:2717-2724, 2003).

En una realización, un péptido de acceso enlazado a un agente ARNi y/o al oligómero de transporte puede ser un péptido α -helicoidal anfipático. Péptidos α -helicoidales anfipáticos ejemplares incluyen, sin limitación, cecropinas, licotoxinas, paradaxinas, buforina, CPF, un péptido de tipo bombinina (BLP), catelicidinas, ceratotoxinas, péptidos *S. clava*, péptidos antimicrobianos intestinales del mixino (HFIAP), magaininas, brevininas-2, dermaseptinas, melitinas, pleurocidina, péptidos H2A, péptidos de *Xenopus*, esclulentinas-1 y caerinas. Preferentemente, se considerarán varios factores para mantener la integridad de la estabilidad de la espiral. Por ejemplo, se utilizará un número máximo de residuos de estabilización de la espiral (por ejemplo, leu, ala o lys), y se utilizará un número mínimo de residuos de desestabilización de la espiral (por ejemplo, prolina o unidades monoméricas cíclicas). Se considerará el residuo de cobertura (por ejemplo, Gly es un residuo ejemplar de N-cobertura) y/o se puede usar amidación C-terminal para proporcionar un enlace H adicional para estabilizar la espiral. La formación de puentes salinos entre residuos con cargas opuestas, separados por $i \pm 3$ o $i \pm 4$ posiciones puede proporcionar estabilidad. Por ejemplo, los residuos catiónicos como la lisina, la arginina, la homoarginina, la ornitina o la histidina pueden formar puentes salinos con los residuos aniónicos glutamato o aspartato.

Los ligandos peptídicos y peptidomiméticos incluyen los que se dan de forma natural o los péptidos modificados; por ejemplo, péptidos D o L; péptidos α , β o γ ; péptidos N-metilicos; azapéptidos; péptidos que tienen una o más amidas —es decir enlaces peptídicos sustituidos con uno o más enlaces de urea, tiourea, carbamato o sulfonilo urea—; o péptidos cíclicos.

El ligando de acceso puede ser cualquier ligando que sea capaz de seleccionar un receptor específico como diana. Ejemplos son: folato, GalNAc, galactosa, manosa, manosa-6P, agrupaciones de azúcares, tales como una agrupación de GalNAc, una agrupación de manosa, una agrupación de galactosa o un aptámero. Una agrupación es una combinación de dos o más unidades de azúcar. Los ligandos de acceso también incluyen ligandos de receptores de integrina, ligandos de receptores de quimiocina, transferrina, biotina, ligandos de receptores de serotonina, PSMA, endotelina, GCPII, somatostatina, ligandos de LDL y HDL. Los ligandos también pueden estar basados en un ácido nucleico; por ejemplo, un aptámero. El aptámero puede no estar modificado o tener cualquier combinación de modificaciones dadas a conocer en la presente memoria.

Los agentes de liberación endosomal incluyen imidazoles, poli u oligoimidazoles, PEI, péptidos, péptidos fusogénicos, policaboxilatos, poliacationes, oligo o poli cationes o aniones enmascarados, acetales, poliacetales, cetales/policetales, ortoésteres, polímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas, dendrímeros con cargas catiónicas o aniónicas enmascaradas o no enmascaradas.

Modulador PK significa modulador farmacocinético. Los moduladores PK incluyen lipófilos, ácidos biliares, esteroides, análogos de fosfolípido, péptidos, agentes de enlace proteínico, PEG, vitaminas etc. Moduladores PK ejemplares incluyen, sin limitación, colesterol, ácidos grasos, ácido cólico, ácido litocólico, dialquiliglicéridos, diacilglicéridos, fosfolípidos, esfingolípidos, naproxeno, ibuprofeno, vitamina E, biotina etc. También es sabido que los oligonucleótidos que comprenden varios enlaces de fosforotioato se enlazan con proteínas séricas; así, los oligonucleótidos cortos —por ejemplo, oligonucleótidos de aproximadamente 5 bases, 10 bases, 15 bases o 20 bases— que comprenden múltiples enlaces de fosforotioato en la cadena principal también son válidos para la presente invención como ligandos (por ejemplo, como ligandos de modulación PK).

Además, los aptámeros que se enlazan con componentes séricos (por ejemplo proteínas séricas) también son válidos como ligandos de modulación PK.

Las solicitudes, en tramitación como la presente, USSN 10/916.185, presentada el 10 de agosto de 2004; USSN 10/946.873, presentada el 21 de septiembre de 2004; USSN 10/833.934, presentada el 3 de agosto de , 2007; USSN 11/115.989 presentada el 27 de abril de 2005 y USSN 11/944.227, presentada el 21 de noviembre de 2007 describen otros ligandos válidos en la presente memoria.

Cuando hay presentes dos o más ligandos, los ligandos pueden tener todas las mismas propiedades, tener todas propiedades diferentes o algunos ligandos tener las mismas propiedades mientras otros tienen propiedades diferentes. Por ejemplo, un ligando puede tener propiedades de acceso, tener actividad endosomolítica o tener propiedades de modulación PK. En una realización preferente, todos los ligandos tienen propiedades diferentes.

Los ligandos pueden acoplarse a los oligonucleótidos en diversos lugares; por ejemplo, el extremo 3', el extremo 5', y/o en una posición interna. En realizaciones preferentes, el ligando se une a los oligonucleótidos a través de un enlace intermedio. El ligando o ligando enlazado puede estar presente en un monómero cuando dicho monómero se incorpora en la cadena en crecimiento. En algunas realizaciones, el ligando puede incorporarse mediante su acoplamiento a un monómero "precursor" después de que dicho monómero "precursor" haya sido incorporado en la cadena en crecimiento. Por ejemplo, en una cadena sentido o antisentido en crecimiento puede incorporarse un monómero que tenga, por ejemplo, un enlace con terminación amino (es decir, que no tenga ningún ligando asociado); por ejemplo, TAP-(CH₂)_nNH₂. En una operación posterior —es decir, después de la incorporación del monómero precursor a la cadena—, un ligando que tenga un grupo electrófilo —por ejemplo, un éster pentafluorofenílico o un grupo aldehído— puede unirse subsiguientemente al monómero precursor acoplando el grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal del enlace del monómero precursor.

Para oligonucleótidos bicatenarios, los ligandos pueden unirse a una o a ambas cadenas. En algunas realizaciones, un agente ARNi bicatenario contiene un ligando conjugado a la cadena sentido. En otras realizaciones, un agente ARNi bicatenario contiene un ligando conjugado con la cadena antisentido.

En algunas realizaciones, el ligando puede estar conjugado con nucleobases, restos de azúcar o enlaces internucleosídicos de moléculas de ácido nucleico. La conjugación con nucleobases de purina o de derivados de la misma puede producirse en cualquier posición, incluyendo átomos endocíclicos y exocíclicos. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 6, 7 u 8 de una nucleobase de purina están unidas a un resto conjugado. La conjugación con nucleobases de pirimidina o de derivados de la misma también se puede producir en cualquier posición. En algunas realizaciones, las posiciones 2, 5 y 6 de una nucleobase de pirimidina pueden ser sustituidas con un resto conjugado. La conjugación con restos de azúcar de nucleósidos puede producirse en cualquier átomo de carbono. Átomos de carbono ejemplares de un resto de azúcar que pueden unirse a un resto conjugado incluyen los átomos de carbono 2', 3' y 5'. La posición 1' también se puede unir a un resto conjugado, tal como en un residuo abásico. Los enlaces internucleosídicos también pueden tener restos conjugados. Para enlaces que contienen fósforo (por ejemplo, fosfodiéster, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoamidato, y similares), el resto conjugado puede unirse directamente al átomo de fósforo o a un átomo de O, N o S ligado al átomo de fósforo. Para enlaces internucleosídicos que contienen amina o amida (por ejemplo, APN), el resto conjugado puede unirse al átomo de nitrógeno de la amina o la amida o a un átomo de carbono adyacente.

Hay numerosos métodos de preparación de conjugados de compuestos oligoméricos. Generalmente, un compuesto oligomérico se une a un resto conjugado poniendo en contacto un grupo reactivo (por ejemplo, OH, SH, amina, aldehído carboxílico y similares) del compuesto oligomérico con un grupo reactivo del resto conjugado. En algunas realizaciones, un grupo reactivo es electrófilo y el otro es nucleófilo.

Por ejemplo, un grupo electrófilo puede ser una funcionalidad que contenga carbonilo y un grupo nucleófilo puede ser una amina o un tiol. Los métodos para la conjugación de ácidos nucleicos y los compuestos oligoméricos afines con y sin grupos conectores están bien descritos en la bibliografía, tal como, por ejemplo, in Manoharan, en *Antisense Research and Applications*, Crooke and LeBleu, ed., CRC Press, Boca Ratón, Florida, 1993, Capítulo 17.

Patentes estadounidenses representativas que enseñan la preparación de conjugados de oligonucleótidos incluyen, sin limitación, las patentes estadounidenses n^{os} 4.828.979, 4.948.882, 5.218.105, 5.525.465, 5.541.313, 5.545.730, 5.552.538, 5.578.717, 5.580.731, 5.580.731, 5.591.584, 5.109.124, 5.118.802, 5.138.045, 5.414.077, 5.486.603, 5.512.439, 5.578.718, 5.608.046, 4.587.044, 4.605.735, 4.667.025, 4.762.779, 4.789.737, 4.824.941, 4.835.263, 4.876.335, 4.904.582, 4.958.013, 5.082.830, 5.112.963, 5.214.136, 5.082.830, 5.112.963, 5.149.782, 5.214.136, 5.245.022, 5.254.469, 5.258.506, 5.262.536, 5.272.250, 5.292.873, 5.317.098, 5.371.241, 5.391.723, 5.416.203, 5.451.463, 5.510.475, 5.512.667, 5.514.785, 5.565.552, 5.567.810, 5.574.142, 5.585.481, 5.587.371, 5.595.726, 5.597.696, 5.599.923, 5.599.928, 5.672.662, 5.688.941, 5.714.166, 6.153.737, 6.172.208, 6.300.319, 6.335.434, 6.335.437, 6.395.437, 6.444.806, 6.486.308, 6.525.031, 6.528.631, 6.559.279.

Definiciones

A continuación se proporciona, por conveniencia, el significado de ciertos términos y frases usados en la memoria, en los ejemplos, y en las reivindicaciones adjuntas. Si hay una aparente discrepancia entre el uso de un término en otras partes de esta memoria y su definición proporcionada en esta sección, prevalecerá la definición de esta sección.

Generalmente, "G", "C", "A" y "U" representan cada uno un nucleótido que contiene guanina, citosina, adenina y uracilo como base, respectivamente. Sin embargo, se entenderá que el término "ribonucleótido" o "nucleótido" también puede referirse a un nucleótido modificado, según se detalla posteriormente con mayor detalle, o un resto sucedáneo de sustitución. La persona experta es perfectamente consciente de que guanina, citosina, adenina y uracilo pueden ser sustituidos por otros restos sin alterar sustancialmente las propiedades de emparejamiento de bases de un oligonucleótido, incluyendo un nucleótido que tenga tal resto de sustitución. Por ejemplo, sin limitación, un nucleótido que incluya la inosina como base puede emparejar bases con nucleótidos que contengan adenina, citosina o uracilo. Por ende, los nucleótidos que contienen uracilo, guanina o adenina pueden ser sustituidos en las secuencias de nucleótidos descritos en la presente memoria por un nucleótido que contenga, por ejemplo, inosina. Las secuencias que incluyen tales restos de sustitución son realizaciones descritas en la presente memoria.

Por “Factor VII”, según se usa en la presente memoria, se quiere decir un ARNm, proteína, péptido o polipéptido de Factor VII. La expresión “Factor VII” también es conocido en la técnica como A1132620, Cf7, precursor de factor VII de coagulación, factor VII de coagulación, FVII, acelerador de la conversión de la protrombina sérica, proteína de coagulación FVII y eptacog alfa.

- 5 Según se usa en la presente memoria, “secuencia de acceso” se refiere a una porción contigua de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ARNm formada durante la transcripción del gen, incluyendo ARNm que es producto del procesamiento, por parte del ARM, de un producto primario de transcripción.

10 Según se usa en la presente memoria, la expresión “cadena que incluye una secuencia” se refiere a un oligonucleótido que incluye una cadena de nucleótidos que es descrita por la secuencia a la que se hace referencia usando la nomenclatura estándar de nucleótidos.

15 Según se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique algo distinto, el término “complementario”, cuando es usado en el contexto de un par de nucleótidos, significa un par clásico de Watson-Crick; es decir, GC, AT o AU. También se extiende a emparejamientos clásicos de Watson-Crick en los que uno de los nucleótidos o ambos han sido modificados según se describe en la presente memoria; por ejemplo, por una modificación de ribosa o una modificación de la cadena principal de fosfato. También puede incluir el emparejamiento con una inosina u otra entidad que no altere sustancialmente las propiedades de los emparejamientos de bases.

20 Según se usa en la presente memoria, y a no ser que se indique algo distinto, el término “complementario”, cuando es usado para describir una primera secuencia de nucleótidos en relación con una segunda secuencia de nucleótidos, se refiere a la capacidad de un oligonucleótido o polinucleótido que incluye la primera secuencia de nucleótidos de hibridarse y formar una estructura en doblete, en ciertas condiciones, con un oligonucleótido o polinucleótido que incluye la segunda secuencia de nucleótidos, según entenderá la persona experta. La complementariedad puede incluir complementariedad plena, complementariedad sustancial y complementariedad suficiente para permitir la hibridación en condiciones fisiológicas; por ejemplo, en condiciones fisiológicamente relevantes, como las que se encuentran dentro de un organismo. La complementariedad plena se refiere a la complementariedad, según se ha
25 definido anteriormente para un par individual, en todos los pares de las secuencias primera y segunda. Cuando una secuencia es “sustancialmente complementaria” con respecto a una segunda secuencia de la presente memoria, las dos secuencias pueden ser completamente complementarias, o pueden formar uno o más, pero generalmente no más de 4, 3 o 2 pares de bases discrepantes tras la hibridación, mientras retienen la capacidad de hibridarse en las condiciones de máxima relevancia para su aplicación final. La complementariedad sustancial también puede ser
30 definida como hibridación en condiciones estrictas, pudiendo incluir las condiciones estrictas: 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6,4, 1 mM EDTA, 50°C o 70°C durante 12-16 horas seguida por lavado. La persona experta podrá determinar el conjunto de condiciones más apropiado para un ensayo de complementariedad de dos secuencias según la aplicación final de los nucleótidos hibridados.

35 Sin embargo, cuando se diseñan dos oligonucleótidos para que formen, tras su hibridación, una o más protuberancias monocatenarias, tales protuberancias no serán consideradas discrepancias con respecto a la determinación de la complementariedad. Por ejemplo, un ARNbc que incluya un oligonucleótido de 21 nucleótidos de longitud y otro oligonucleótido de 23 nucleótidos de longitud, incluyendo el oligonucleótido más largo una secuencia de 21 nucleótidos que es completamente complementaria del oligonucleótido más corto, se puede seguir diciendo de él que es “completamente complementario”.

40 Las secuencias “complementarias”, según se usa la expresión en la presente memoria, también pueden incluir pares de bases distintos de los de Watson-Crick, o estar formadas completamente de ellos, y/o pares de bases de nucleótidos no naturales y modificados, en la medida que se cumplan los anteriores requisitos con respecto a su capacidad de hibridarse.

45 Las expresiones “complementario”, “completamente complementario”, “sustancialmente complementario” y “suficientemente complementario” para permitir la hibridación en condiciones fisiológicas —por ejemplo, en condiciones fisiológicamente relevantes como pueden encontrarse dentro de un organismo— pueden ser usadas en la presente memoria con respecto a una coincidencia de bases entre la cadena sentido y la cadena antisentido de un ARNbc, o entre la cadena antisentido de un ARNbc y una secuencia de acceso, según se entenderá por el contexto de su uso.

50 Según se usa en la presente memoria, un polinucleótido que sea “complementario” —por ejemplo, sustancialmente complementario— de al menos parte de un ARN mensajero (ARNm) se refiere a un polinucleótido que es complementario —por ejemplo, sustancialmente complementario— de una porción contigua del ARNm de interés (que codifique, por ejemplo, el Factor VII). Por ejemplo, un polinucleótido es complementario de al menos una parte de un ARNm de Factor VII si la secuencia es sustancialmente complementaria de una porción ininterrumpida de un ARNm
55 que codifica el Factor VII.

La expresión “ARN bicatenario” o “ARNbc”, según es usada en la presente memoria, se refiere a una molécula de ácido ribonucleico, o a un complejo de moléculas de ácido ribonucleico, que tiene una estructura en doblete que incluye dos cadenas antiparalelas y sustancialmente complementarias, según se ha definido más arriba, de ácido nucleico.

Las dos cadenas que forman la estructura en doble pueden ser porciones diferentes de una molécula de ARN mayor, o pueden ser moléculas separadas de ARN. Cuando las dos cadenas forman parte de una molécula mayor y, por lo tanto, están conectadas por una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva formando la estructura en doblete, se denomina a la cadena conectora de ARN "bucle en horquilla". Cuando las dos cadenas están conectadas de forma covalente por medios distintos de una cadena ininterrumpida de nucleótidos entre el extremo 3' de una cadena y el extremo 5' de la otra cadena respectiva formando la estructura en doblete, se denomina "conector" a la estructura conectora. Las cadenas de ARN pueden tener un número igual o diferente de nucleótidos. El máximo número de pares de bases es el número de nucleótidos de la cadena más corta del ARNbc. Además de la estructura en doblete, un ARNbc puede comprender una o más protuberancias nucleotídicas. Un ARNbc, según se usa la expresión en la presente memoria, también es denominado "ARN inhibidor pequeño", "ARNip", "agente ARNip", "agente ARNi" o "agente iARN".

Según se usa en la presente memoria, "protuberancia nucleotídica" se refiere al nucleótido o a los nucleótidos no emparejados que sobresalen de la estructura en doblete de un ARNbc cuando un extremo 3' de una cadena del ARNbc se extiende más allá del extremo 5' de la otra cadena, o viceversa. "Romo" o "extremo romo" significa que no hay ningún nucleótidos sin emparejar en el extremo del ARNbc; es decir, ninguna protuberancia nucleotídica. Un ARNbc de "extremo romo" es un ARNbc que es bicatenario en toda su longitud; es decir, sin ninguna protuberancia nucleotídica en ningún extremo de la molécula.

La expresión "cadena antisentido" se refiere a la cadena de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria de una secuencia de acceso. Según se usa en la presente memoria, la expresión "región de complementariedad" se refiere a la región de una cadena antisentido que es sustancialmente complementaria de una secuencia —por ejemplo, una secuencia de acceso— definida en la presente memoria. Cuando la región de complementariedad no es complemente complementaria de la secuencia de acceso, siendo las discrepancias máximamente toleradas en las regiones terminales y, si están presentes, están generalmente en una región o en regiones terminales; por ejemplo, dentro de los 6, 5, 4, 3 o 2 nucleótidos de los terminales 5' y/o 3'.

La expresión "cadena sentido", según se usa en la presente memoria, se refiere a la cadena de un ARNbc que incluye una región que es sustancialmente complementaria de una región de la cadena antisentido.

El término "identidad" es la relación entre dos o más secuencias de polinucleótidos, determinada comparando las secuencias. Identidad también significa el grado de relación secuencial entre las secuencias de polinucleótidos, determinada por la coincidencia entre las cadenas de tales secuencias. Aunque existen varios métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polinucleótidos, el término es muy conocido para los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press (1987); y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov., M. y Devereux, J., ed., M. Stockton Press, Nueva York (1991)). "Sustancialmente idéntico", según se usa en la presente memoria, significa que hay un grado muy alto de homología (preferentemente, una identidad de secuencias del 100%) entre la cadena sentido del ARNbc y la correspondiente parte del gen diana. Sin embargo, en la presente memoria puede usarse un ARNbc que tenga una identidad de secuencias mayor del 90% o el 95%, y, así, pueden tolerarse variaciones de secuencia que cabría esperar debido a una mutación genética, a polimorfismo de cepas o a diferencia evolutiva. Aunque se prefiere una identidad del 100%, el ARNbc puede contener discrepancias aleatorias únicas o múltiples de pares de bases entre el ARN y el gen diana.

"Introducir en una célula", cuando se refiere a un ARNbc, significa facilitar la captación o absorción en la célula, tal como entienden los expertos en la técnica. La absorción o captación del ARNbc puede producirse a través de procesos celulares difusivos sin ayuda o activos, o por medio de agente o dispositivos auxiliares. El significado de esta expresión no está limitado a células *in vitro*; un ARNbc también puede ser "introducido en una célula", siendo la célula parte de un organismo vivo. En tal caso, la introducción en la célula incluirá la administración al organismo. Por ejemplo, para una administración *in vivo*, el ARNbc puede ser inyectado en un sitio tisular o ser administrado sistémicamente. La introducción *in vitro* en una célula incluye métodos conocidos en la técnica, tales como electroporación y lipofección.

Las expresiones "silenciar" e "inhibir la expresión de", en la medida en que se refieran al gen del Factor VII, se refieren en la presente memoria a la supresión, al menos parcial, de la expresión del gen del Factor VII, manifestada por una reducción de la cantidad de ARNm proveniente del gen del Factor VII que puede ser aislada de una primera célula o de un primer grupo de células en las que está transcrito el gen del Factor VII y que ha sido tratada o han sido tratadas de modo que se inhiba la expresión del gen del Factor VII, en comparación con una segunda célula o un segundo grupo de células sustancialmente idénticas a la primera célula o al primer grupo de células, pero que no ha sido tratada o no han sido tratadas de esa manera (células de control). El grado de inhibición suele expresarse en términos de

$$\frac{(\text{ARNm en células de control}) - (\text{ARNm en células tratadas})}{(\text{ARNm en células de control})} \cdot 100\%$$

Alternativamente, el grado de inhibición puede ser dado en términos de una reducción de un parámetro que esté funcionalmente ligado a la transcripción del gen del Factor VII; por ejemplo, la cantidad de proteína codificada por el gen del Factor VII que es segregada por una célula, o el número de células que presentan cierto fenotipo —por ejemplo, apoptosis—. En principio, el silenciamiento génico del Factor VII puede ser determinado en cualquier célula

que exprese la diana, ya sea constitutivamente o por ingeniería genómica, y por cualquier ensayo apropiado. Sin embargo, cuando se necesita una referencia para determinar si un ARNip dado inhibe la expresión del gen del Factor VII en cierto grado, los ensayos proporcionados en los siguientes Ejemplos servirán de tal referencia.

5 Por ejemplo, en ciertos casos, la expresión del gen del Factor VII es suprimida en al menos aproximadamente 20%, 25%, 35%, 40% o 50% mediante la administración del oligonucleótido bicatenario descrito en la presente memoria. En una realización, el gen del Factor VII es suprimido en al menos aproximadamente 60%, 70% u 80% mediante la administración del oligonucleótido bicatenario descrito en la presente memoria. En una realización más preferente, el gen del Factor VII es suprimido en al menos aproximadamente 85%, 90% o 95% mediante la administración del oligonucleótido bicatenario descrito en la presente memoria.

10 Los términos “tratar”, “tratamiento” y similares se refieren al alivio o a la paliación de una enfermedad o un trastorno. En la medida en la que estén relacionados con cualquiera de las otras condiciones enumeradas a continuación en la presente memoria (por ejemplo, una afección arbitrada por el Factor VII distinta del trastorno trombótico), los términos “tratar”, “tratamiento” y similares significan aliviar o paliar al menos un síntoma asociado con tal afección, o ralentizar o invertir el avance de tal afección.

15 Una composición “terapéuticamente relevante” puede paliar una enfermedad o un trastorno, o un síntoma de una enfermedad o de un trastorno cuando es administrada a una dosis apropiada.

20 Según se usa en la presente memoria, la expresión “afección o enfermedad arbitrada por el Factor VII” y términos y frases afines se refieren a un trastorno o afección caracterizado por una actividad inapropiada —por ejemplo mayor de la normal— del Factor VII. Una actividad funcional inapropiada del Factor VII podría surgir como consecuencia de la expresión del Factor VII en células que normalmente no expresan el Factor VII, o mayor expresión del Factor VII (que lleva, por ejemplo, a un síntoma de la fiebre hemorrágica viral, o a un trombo). Una afección o enfermedad arbitrada por el Factor VII puede estar arbitrada completa o parcialmente por una actividad funcional inapropiada del Factor VII. Sin embargo, una afección o enfermedad arbitrada por el Factor VII es aquella en la que la modulación del Factor VII da lugar a algún efecto en el trastorno o afección subyacente (por ejemplo, un inhibidor del Factor VII da lugar a cierta mejoría en el bienestar del paciente en al menos algunos pacientes).

Una “fiebre hemorrágica” incluye una combinación de enfermedades causadas por una infección viral. Los síntomas febriles y gastrointestinales son normalmente seguidos por la hemorragia de los capilares.

Una “coagulopatía” es cualquier defecto en el mecanismo de coagulación de la sangre de un sujeto.

30 Según se usa en la presente memoria, un “trastorno trombótico” es cualquier trastorno que, preferentemente, sea consecuencia de una expresión no deseada de FVII, incluyendo cualquier trastorno caracterizado por una coagulación sanguínea no deseada.

35 Según se usan en la presente memoria, las frases “cantidad terapéuticamente efectiva” y “cantidad profilácticamente efectiva” se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, la prevención o la gestión de una fiebre hemorrágica viral, o en un síntoma manifiesto de tal trastorno; por ejemplo, hemorragia, fiebre, debilidad, dolor muscular, dolor de cabeza, inflamación o choque circulatorio. La cantidad específica que es terapéuticamente efectiva puede ser determinada fácilmente por un profesional médico normal, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnicas, tales como, por ejemplo, el tipo de trastorno trombótico, el historial y la edad del paciente, la fase de la enfermedad y la administración de otros agentes.

40 Según se usa en la presente memoria, una “composición farmacéutica” incluye una cantidad farmacológicamente efectiva de un ARNbc y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Según se usa en la presente memoria, “cantidad farmacológicamente efectiva”, “cantidad terapéuticamente efectiva” o, simplemente, “cantidad efectiva” se refiere a aquella cantidad de un ARN efectiva para producir el resultado farmacológico, terapéutico o preventivo previsto. Por ejemplo, si se considera efectivo un tratamiento clínico dado cuando hay una reducción de al menos un 25% en un parámetro medible asociado con un trastorno o enfermedad, una cantidad terapéuticamente efectiva de un fármaco para el tratamiento de ese trastorno o enfermedad es la cantidad necesaria para efectuar una reducción de al menos un 25% en ese parámetro.

45 La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a un vehículo para la administración de un agente terapéutico. Tales vehículo incluyen, sin limitación, suero fisiológico, suero fisiológico tamponado, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La expresión excluye específicamente caldos de cultivo celular. Para fármacos administrados oralmente, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como diluyentes inertes, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, edulcorantes, aromatizantes, colorantes y conservantes. Diluyentes inertes adecuados incluyen carbonato sódico y cálcico, fosfato sódico y cálcico, y lactosa, mientras que el almidón de maíz y el ácido alginico son desintegrantes adecuados. Los aglutinantes pueden incluir almidón y gelatina, mientras que el lubricante, si está presente, generalmente será estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Si se desea, los comprimidos pueden estar recubiertos de un material tal como monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo, para retardar la absorción en el tracto gastrointestinal.

Según se usa en la presente memoria, una “célula transformada” es una célula en la que se ha introducido un vector a partir del cual puede expresarse una molécula de ARNbc.

Catalogación de las partículas de ácido nucleico-lípido

5 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos y composiciones para producir partículas de lípido-ácido nucleico encapsulado en las que los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de una capa lipídica. Tales partículas de ácido nucleico-lípido, que incorporan oligonucleótidos de ARNip, son catalogadas usando diversos parámetros biofísicos, que incluyen: (1) proporción entre fármaco y lípido; (2) eficacia de la encapsulación; y (3) tamaño de las partículas. Son deseables proporciones elevadas entre fármaco y lípido, una alta eficacia de la encapsulación, buena resistencia a la nucleasa y estabilidad sérica, y un tamaño controlable de las partículas, generalmente menor de 200 nm de diámetro. Además, la naturaleza del polímero de ácido nucleico es significativa, dado que la modificación de ácidos nucleicos en un esfuerzo por impartir resistencia a la nucleasa aumenta el coste de los productos terapéuticos a la vez que, en muchos casos, proporciona únicamente una resistencia limitada. A no ser que se indique otra cosa, estos criterios se calculan en esta memoria como sigue:

15 La proporción entre fármaco y lípido es la cantidad de ácido nucleico en un volumen definido de preparación dividida por la cantidad de lípido en el mismo volumen. Esto puede ser mol por mol, peso por peso o peso por mol. Para formulaciones finales listas para su administración, la proporción ácido nucleico:lípido se calcula después de que se hayan empleado la diálisis, la cromatografía y la digestión enzimática (por ejemplo, por la nucleasa) para eliminar tanto del ácido nucleico externo como sea posible;

20 la eficacia de la encapsulación se refiere a la proporción entre fármaco y lípido de la mezcla de partida dividida por la proporción entre fármaco y lípido de la formulación final lista para la administración. Esta es una medida de eficacia relativa. Para una medida de la eficacia absoluta, también se puede calcular la cantidad total de ácido nucleico añadida a la mezcla de partida que acaba en la formulación lista para la administración. También se puede calcular la cantidad de lípido perdida durante el proceso de formulación. La eficacia es una medida del desperdicio y del gasto de la formulación; y

25 el tamaño indica la dimensión (diámetro) de las partículas formadas. La distribución de tamaños puede ser determinada usando dispersión cuasi elástica de la luz (QELS) en un dimensionador de partículas submicrométricas Nicomp Modelo 370. Se prefieren las partículas de menos de 200 nm para la distribución a tejidos neovascularizados (con fugas), tales como neoplasias y sitios de inflamación.

Métodos de preparación de partículas lipídicas

30 Los métodos y las composiciones descritos en la presente memoria hacen uso de ciertos lípidos catiónicos, cuya síntesis, preparación y catalogación se describen a continuación y en los Ejemplos adjuntos. Además, en la presente memoria se describen métodos de preparación de partículas lipídicas, que incluyen los asociados con un agente terapéutico; por ejemplo, un ácido nucleico. En los métodos descritos en la presente memoria, se combina una mezcla de lípidos con una solución acuosa tamponada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene

35 ácido nucleico encapsulado en partículas lipídicas en las que los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una proporción ácido nucleico/lípido de aproximadamente un 3% en peso a aproximadamente un 25% en peso, preferentemente del 5 al 15% en peso. La mezcla intermedia puede ser dimensionada opcionalmente para obtener partículas de lípido-ácido nucleico encapsulado en las que las porciones lipídicas son vesículas unilamelares que, preferentemente, tienen un diámetro de 30 a 150 nm, más preferentemente de aproximadamente 40 a 90 nm. El pH es elevado a continuación para neutralizar al menos una porción de las cargas superficiales en las partículas de lípidos-ácidos nucleicos, proporcionando así una composición lípido-ácido nucleico encapsulado neutralizada en superficie al menos parcialmente.

Según se ha descrito anteriormente, varios de estos lípidos catiónicos son aminolípidos que están cargados a un pH por debajo del pK_a del grupo amino y son sustancialmente neutros a un pH por encima del pK_a . Estos lípidos catiónicos son denominados lípidos catiónicos valorables y pueden ser usados en las formulaciones descritas en la presente memoria usando un procedimiento en dos etapas. En primer lugar, pueden formarse vesículas lipídicas al pH inferior con lípidos catiónicos valorables y otros componentes vesiculares en presencia de ácidos nucleicos. De esta manera, las vesículas encapsularán y atraparán los ácidos nucleicos. En segundo lugar, la carga superficial de las vesículas recién formadas puede ser neutralizada aumentando el pH del caldo hasta un nivel por encima del pK_a de los lípidos catiónicos valorables presentes; es decir, hasta el pH fisiológico o superior. Aspectos particularmente ventajosos de este proceso incluyen tanto la simple eliminación de cualquier ácido nucleico adsorbido en superficie como un vehículo de distribución del ácido nucleico resultante que tiene una superficie neutra. Cabe esperar que los liposomas o partículas lipídicas que tienen una superficie neutra eviten su rápida eliminación de la circulación y eviten ciertas toxicidades que están asociadas con las preparaciones de liposomas catiónicos. La patente estadounidense nº 6.287.591 y la patente estadounidense nº 6.858.225 proporcionan detalles adicionales relativos a estos usos de tales lípidos catiónicos valorables en la formulación de partículas de ácido nucleico-lípido.

55

Se hace notar, además, que las vesículas formadas de esta manera proporcionan formulaciones de tamaño de vesícula uniforme, con alto contenido de ácidos nucleicos. Además, las vesículas tienen un intervalo de tamaño de aproximadamente 30 a aproximadamente 150 nm, más preferentemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 90 nm.

60

Sin pretender entrar en consideraciones teóricas particulares, se cree que la altísima eficacia de la encapsulación del ácido nucleico es consecuencia de la interacción electrostática a bajo pH. Con pH ácido (por ejemplo pH 4,0), la superficie de la vesícula está cargada y se enlaza con una porción de los ácidos nucleicos a través de interacciones electrostáticas. Cuando el tampón ácido externo es intercambiado con un tampón más neutro (por ejemplo, pH 7,5), la superficie de la partícula lipídica o liposoma es neutralizada, permitiendo que cualquier ácido nucleico externo sea eliminado. Diversas publicaciones proporcionan información más detallada sobre el procedimiento de la formulación (por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.287.591 y la patente estadounidense nº 6.858.225).

En vista de lo anterior, en la presente memoria se describen métodos de preparación de formulaciones de lípido/ácido nucleico. En los métodos descritos en la presente memoria, se combina una mezcla de lípidos con una solución acuosa tamponada de ácido nucleico para producir una mezcla intermedia que contiene ácido nucleico encapsulado en partículas lipídicas, en la que, por ejemplo, los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una proporción ácido nucleico/lípido de aproximadamente un 10% en peso a aproximadamente un 20% en peso. La mezcla intermedia puede ser opcionalmente dimensionada para obtener partículas de lípido-ácido nucleico encapsulado en las que las porciones lipídicas son vesículas unilamelares que, preferentemente, tienen un diámetro de 30 a 150 nm, más preferentemente de aproximadamente 40 a 90 nm. A continuación, se eleva el pH para neutralizar al menos una porción de las cargas de superficie en las partículas de lípidos-ácidos nucleicos, proporcionando así una composición de lípido-ácido nucleico encapsulado neutralizada en superficie al menos parcialmente.

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

En la preparación de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria, la mezcla de lípidos es normalmente una solución de lípidos en un disolvente orgánico. Esta mezcla de lípidos puede ser entonces secada para formar una película delgada o ser liofilizada para formar un polvo antes de ser hidratada con un tampón acuoso para formar liposomas. Alternativamente, en un método preferido, la mezcla lipídica puede ser solubilizada en un alcohol miscible en agua, tal como etanol, y esta solución etanólica ser añadida a un tampón acuoso, dando lugar a la formación espontánea de liposomas. En la mayoría de las realizaciones, el alcohol es usado en la forma en que está disponible comercialmente. Por ejemplo, el etanol puede ser usado como etanol absoluto (100%), o como etanol al 95%, siendo agua lo restante. Este método es descrito con mayor detalle en la patente estadounidense nº 5.976.567).

En una realización ejemplar, la mezcla de lípidos es una mezcla de lípidos catiónicos, lípidos neutros (distintos de un lípido catiónico), un esteroles (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-DMG o un PEG-cDMA) en un disolvente alcohólico. En realizaciones preferentes, la mezcla lipídica consiste esencialmente en un lípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG en alcohol, más preferentemente etanol. En realizaciones preferentes adicionales, la primera solución consiste en la mezcla lipídica anterior en proporciones molares de aproximadamente 20-70% lípido catiónico:5-45% lípido neutro:20-55% colesterol:0,5-15% lípido modificado con PEG. En otras realizaciones adicionales preferentes, la primera solución consiste esencialmente en un lípido elegido de la Tabla 1, DSPC, colesterol y PEG-DMG o PEG-cDMA, más preferentemente en una proporción molar de aproximadamente 20-60% lípido catiónico:5-25% DSPC:25-55% colesterol:0,5-15% PEG-DMG o PEG-DMA. En realizaciones particulares, la proporción molar de lípidos es aproximadamente 50/10/38,5/1,5 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DMG, PEG-DSG o PEG-DPG), 57,2/7,1/34,3/1,4 (porcentajes molares de lípido catiónico/DPPC/colesterol/PEG-cDMA), 40/15/40/5 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DMG), 50/10/35/4,5/0,5 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DSG o GalNAc3-PEG-DSG), 50/10/35/5 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DMG), 40/10/40/10 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA), 35/15/40/10 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA) o 52/13/30/5 (porcentajes molares de lípido catiónico/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA). En otro grupo de realizaciones preferentes, el lípido neutro en estas composiciones es sustituido con POPC, DPPC, DOPE o SM. La mezcla lipídica se combina con una solución acuosa tamponada que puede contener los ácidos nucleicos. La solución acuosa tamponada es normalmente una solución en la que el tampón tiene un pH inferior al pK_a del lípido protonable en la mezcla lipídica. Ejemplos de tampones adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato y MES. Un tampón particularmente preferido en el tampón citrato. Los tampones preferidos estarán en el intervalo de 1-1000 mM del anión, dependiendo de la química del ácido nucleico que se encapsule, y la optimización de la concentración del tampón puede ser significativa para lograr niveles elevados de carga, (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense nº 6.287.591 y la patente estadounidense nº 6.858.225). Alternativamente, puede resultar útil el agua pura acidulada hasta un pH de 5-6 con cloruro, sulfato o similares. En este caso, puede ser adecuado añadir un 5% de glucosa, u otro soluto no iónico que equilibre el potencial osmótico a través de la membrana de las partículas cuando las partículas sean dializadas para eliminar el etanol, aumentar el pH, o mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como suero fisiológico normal. La cantidad de ácido nucleico en el tampón puede variar, pero normalmente estará entre aproximadamente 0,01 mg/mL y aproximadamente 200 mg/mL, más preferentemente entre aproximadamente 0,5 mg/mL y aproximadamente 50 mg/mL.

La mezcla de lípidos y de la solución acuosa tamponada de ácidos nucleicos terapéuticos es combinada para proporcionar una mezcla intermedia. La mezcla intermedia es normalmente una mezcla de partículas lipídicas que tienen ácidos nucleicos encapsulados. Además, la mezcla intermedia también puede contener cierta porción de ácidos nucleicos que están unidos a la superficie de las partículas lipídicas (liposomas o vesículas lipídicas) debido a la atracción iónica entre los ácidos nucleicos cargados negativamente y los lípidos cargados positivamente en la superficie de la partícula lipídica (los aminolípidos u otros lípidos que forman el primer componente lipídico protonable entre realizaciones preferentes, la mezcla de lípidos es una solución alcohólica de lípidos, y los volúmenes de cada una de las soluciones se ajusta para que, tras su combinación, el contenido resultante de alcohol esté entre aproximadamente un 20% en volumen y aproximadamente un 45% en volumen. El método de combinación de las mezclas puede incluir cualquiera de diversos procedimientos, dependiendo a menudo de la escala de la formulación producida. Por ejemplo, cuando el volumen total sea aproximadamente 10-20 mL o menos, las soluciones pueden combinarse en un tubo de ensayo y ser agitadas conjuntamente usando un mezclador vorticial. Los procesos a gran escala pueden llevarse a cabo en recipientes de vidrio adecuados para la producción.

Opcionalmente, los complejos de lípido-agente terapéutico encapsulado (por ejemplo, ácido nucleico) que se producen combinando la mezcla lipídica y la solución acuosa tamponada de agentes terapéuticos (ácidos nucleicos) pueden ser dimensionados para lograr una gama de tamaños deseados y una distribución relativamente estrecha de tamaños de las partículas lipídicas. Preferentemente, las composiciones proporcionadas en la presente memoria están dimensionadas a un diámetro medio entre aproximadamente 70 y aproximadamente 200 nm, más preferentemente entre aproximadamente 90 y aproximadamente 130 nm. Hay disponibles varias técnicas para dimensionar los liposomas hasta un tamaño deseado. La patente estadounidense n° 4.737.323 describe un método de dimensionamiento. Someter a ultrasonidos a una suspensión de liposomas, ya sea en baño o mediante sonicación por sonda, produce una progresiva reducción de tamaño hasta llegar a pequeñas vesículas unilamelares (SUV) con un tamaño inferior a aproximadamente 0,05 micrómetros. La homogeneización es otro método que se vale de la energía de cizallamiento para fragmentar liposomas grandes en otros más pequeños. En un procedimiento de homogeneización típico, se hace que las vesículas multilamelares recirculen por un homogeneizador estándar de emulsiones hasta que se observan los tamaños seleccionados de los liposomas, normalmente entre aproximadamente 0,1 y 0,5 micrómetros. En ambos métodos, la distribución del tamaño de las partículas puede ser monitorizada mediante determinación convencional del tamaño de las partículas por rayo láser. Para ciertos métodos de la presente memoria, se usa la extrusión para obtener un tamaño uniforme de las vesículas.

La extrusión de composiciones liposomales a través de una membrana de policarbonato de poros pequeños o de una membrana cerámica asimétrica da lugar a una distribución de tamaños relativamente bien definida. Normalmente, la suspensión es sometida a un ciclo a través de la membrana una o más veces hasta que se logra la distribución deseada de tamaños del complejo liposomal. Los liposomas pueden ser extrudidos a través de membranas de poros sucesivamente más pequeños, para lograr una reducción gradual en el tamaño de los liposomas. En algunos casos, las composiciones de lípido-ácido nucleico que se forman pueden ser usadas sin ningún dimensionamiento.

En realizaciones particulares, los métodos descritos en la presente memoria comprenden, además, una etapa de neutralización de al menos algunas de las cargas superficiales en las porciones lipídicas de las composiciones de lípido-ácido nucleico. Al neutralizar, al menos parcialmente, las cargas superficiales, el ácido nucleico no encapsulado es liberado de la superficie de la partícula lipídica y puede ser eliminado de la composición usando técnicas convencionales. Preferentemente, los ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en superficie son eliminados de las composiciones resultantes mediante intercambio de soluciones tampón. Por ejemplo, la sustitución de un tampón citrato (pH de aproximadamente 4,0, usado para formar las composiciones) con una solución de suero fisiológico tamponada con HEPES (HBS pH de aproximadamente 7,5) da lugar a la neutralización de la superficie de los liposomas y a la liberación del ácido nucleico de la superficie. A continuación, el ácido nucleico liberado puede ser eliminado mediante cromatografía usando métodos estándar, y luego ser metido en un tampón con un pH por encima del pK_a del lípido usado.

Opcionalmente, las vesículas lipídicas (es decir, las partículas lipídicas) pueden formarse por hidratación en un tampón acuoso y ser dimensionadas usando cualquiera de los métodos anteriormente descritos antes de la adición del ácido nucleico. Según se ha descrito anteriormente, el tampón acuoso debería tener un pH inferior al pK_a del aminolípido. A continuación, puede añadirse una solución de los ácidos nucleicos a estas vesículas preformadas dimensionadas. Para permitir la encapsulación de ácidos nucleicos en tales vesículas "preformadas", la mezcla debería contener un alcohol, tal como etanol. En el caso del etanol, debería estar presente a una concentración entre aproximadamente un 20% (p/p) y aproximadamente un 45% (p/p). Además, puede ser necesario calentar la mezcla de vesículas preformadas y ácido nucleico en la mezcla de tampón acuoso-etanol hasta una temperatura entre aproximadamente 25°C y aproximadamente 50°C, dependiendo de la composición de las vesículas lipídicas y de la naturaleza del ácido nucleico. Resultará evidente para una persona con un dominio normal de la técnica que la optimización del procedimiento de encapsulación para lograr un nivel deseado de ácido nucleico en las vesículas lipídicas requerirá de variables tales como la concentración del etanol y la temperatura. Los Ejemplos proporcionan ejemplos de condiciones adecuadas para la encapsulación de ácidos nucleicos. Una vez que los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de las vesículas preformadas, puede aumentarse el pH externo hasta neutralizar, al menos parcialmente, la carga superficial. A continuación, los ácidos nucleicos no encapsulados y adsorbidos en superficie pueden ser eliminados según se ha descrito anteriormente.

Método de uso

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria pueden ser usadas para administrar un agente terapéutico a una célula, *in vitro* o *in vivo*. En realizaciones particulares, el agente terapéutico es un ácido nucleico, que es administrado a una célula usando una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la presente memoria. Aunque la

- 5 la siguiente descripción de diversos métodos de uso de las partículas lipídicas y de las composiciones farmacéuticas relacionadas descritas en la presente memoria está ejemplificada por la descripción relativa a partículas de ácido nucleico-lípido, se entiende que estos métodos y estas composiciones pueden ser adaptados fácilmente para la administración de cualquier agente terapéutico para el tratamiento de cualquier trastorno o enfermedad que se beneficie de tal tratamiento.
- 10 En ciertas realizaciones, en la presente memoria se describen métodos de introducción de un ácido nucleico en una célula. Los ácidos nucleicos preferidos para su introducción en células son el ARNip, los oligonucleótidos estimulantes del sistema inmunitario, los plásmidos, el antisentido y las ribozimas. Estos métodos pueden llevarse a cabo poniendo en contacto las partículas o composiciones descritas en la presente memoria con las células durante un periodo de tiempo suficiente para que se produzca la distribución intracelular.
- 15 Las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser adsorbidas en casi cualquier tipo de célula; por ejemplo, líneas de células tumorales, incluyendo, sin limitación, líneas celulares HeLa, HCT116, A375, MCF7, B16F10, Hep3b, HUH7, HepG2, Skov3, U87 y PC3. Una vez adsorbidas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden ser endocitosadas por una porción una porción de las células, intercambiar lípidos con las membranas celulares o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la porción de ácido nucleico del complejo puede tener
- 20 lugar a través de uno cualquiera de estos sistemas. Se cree que, en el caso de partículas captadas en la célula por endocitosis, las partículas interactúan entonces con la membrana endosomal, dando lugar a la desestabilización de la membrana endosomal, posiblemente por la formación de fases no bicapa, dando lugar a la introducción del ácido nucleico encapsulado en el citoplasma celular. De modo similar, en el caso de la fusión directa de las partículas con la membrana citoplasmática, cuando tiene lugar la fusión, la membrana liposomal se integrada en la membrana celular y el contenido del liposoma se combina con el fluido intracelular. El contacto entre las células y las composiciones de
- 25 lípido-ácido nucleico, cuando se lleva a cabo *in vitro*, tendrá lugar en un caldo compatible biológicamente. La concentración de las composiciones puede variar ampliamente, dependiendo de la aplicación particular, pero generalmente se encuentra entre aproximadamente 1 μmol y aproximadamente 10 mmol . En ciertas realizaciones, el tratamiento de las células con las composiciones de lípido-ácido nucleico generalmente se llevará a cabo a temperaturas fisiológicas (en torno a 37°C) durante periodos de tiempo de aproximadamente 1 a 24 horas, preferentemente de aproximadamente 2 a 8 horas. Para aplicaciones *in vitro*, la administración de ácidos nucleicos puede ser a cualquier célula desarrollada en un cultivo, ya sea de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferentes, las células serán células animales, más preferentemente células de mamífero, y lo más preferible es que sean células humanas.
- 30 En un grupo de realizaciones, se añade una suspensión de partículas de lípido-ácido nucleico a células confluentes en un 60-80% puestas en placas de cultivo que tienen una densidad entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^5 células/mL, más preferentemente de aproximadamente 2×10^4 células/mL. La concentración de la suspensión añadida a las células se encuentra, preferentemente, entre aproximadamente 0,01 y 20 $\mu\text{g/mL}$, siendo más preferentemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g/mL}$.
- 35 Las aplicaciones típicas incluyen el uso de procedimientos muy conocidos para proporcionar una administración intracelular de ARNip para eliminar o silenciar dianas celulares específicas. Alternativamente, las aplicaciones incluyen la administración de secuencias de ADN o ARNm que codifican polipéptidos terapéuticamente útiles. De esta manera, se proporciona una terapia para enfermedades genéticas suministrando productos de genes deficientes o ausentes (es decir, para la distrofia de Duchenne, véase Kunkel, et al., *Brit. Med. Bull.* 45(3):630-643 (1989), y para la fibrosis
- 40 quística, véase Goodfellow, *Nature* 341:102-103 (1989)). Otros usos para las composiciones descritas en la presente memoria incluyen la introducción de oligonucleótidos antisentido en células (véase Bennett, et al., *Mol. Pharm.* 41:1023-1033 (1992)).

Alternativamente, las composiciones descritas en la presente memoria también pueden ser usadas para administrar ácidos nucleicos a células *in vivo*, usando métodos que son conocidos para los expertos en la técnica. Con respecto

50 a la aplicación de la invención para la administración de secuencias de ADN o ARNm, Zhu, et al., *Science* 261:209-211 (1993), describe la administración intravenosa de un plásmido de expresión de la citomegalovirus (CMV)-cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) usando complejos DOTMA-DOPE. Hyde, et al., *Nature* 362:250-256 (1993), describe la administración del gen regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) a epitelios de la vía aérea y a los alveolos en el pulmón de ratones, usando liposomas. Brigham, et al., *Am. J. Med. Sci.* 298:278-281 (1989), describe la transfección *in vivo* de pulmones de ratones con un gen procariota funcional que codifica la enzima intracelular cloranfenicol acetiltransferasa (CAT). Así, las composiciones descritas en la presente memoria pueden ser usadas en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

- Por lo tanto, en otro aspecto, las formulaciones descritas en la presente memoria pueden ser usadas para silenciar o modular un gen diana, tal como, sin limitación, FVII, Eg5, PCSK9, TPX2, apoB, SAA, TTR, RSV, el gen PDGF beta,
- 60 el gen Erb-B, el gen Src, el gen CRK, el gen GRB2, el gen RAS, el gen MEKK, el gen JNK, el gen RAF, el gen Erk1/2,

el gen PCNA(p21), el gen MYB, el gen JUN, el gen FOS, el gen BCL-2, el gen Ciclina D, el gen VEGF, el gen EGFR, el gen Ciclina A, el gen Ciclina E, el gen WNT-1, el gen beta-catenina, el gen c-MET, el gen PKC, el gen NFkB, el gen STAT3, el gen survivina, el gen Her2/Neu, el gen topoisomerasa I, el gen topoisomerasa II alfa, el gen p73, el gen p21(WAF1/CIP1), el gen p27(KIP1), el gen PPM1D, el gen RAS, el gen caveolina I, el gen MIB I, el gen MTAI, el gen M68, genes supresores tumorales, el gen supresor tumoral p53, el miembro DN-p63 de la familia p53, el gen supresor tumoral pRb, el gen supresor tumoral APC1, el gen supresor tumoral BRCA1, el gen supresor tumoral PTEN, el gen de fusión mLL, el gen de fusión BCR/ABL, el gen de fusión TEL/AML1, el gen de fusión EWS/FLI1, el gen de fusión TLS/FUS1, el gen de fusión PAX3/FKHR, el gen de fusión AML1/ETO, el gen alfa v-integrina, el gen receptor Flt-1, el gen tubulina, el gen del virus del papiloma humano, un gen requerido para la duplicación del virus del papiloma humano, el gen del virus de inmunodeficiencia humana, un gen requerido para la duplicación del virus de inmunodeficiencia humana, el gen del virus de la hepatitis A, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis A, el gen del virus de la hepatitis B, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis B, el gen del virus de la hepatitis C, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis C, el gen del virus de la hepatitis D, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis D, el gen del virus de la hepatitis E, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis E, el gen del virus de la hepatitis F, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis F, el gen del virus de la hepatitis G, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis G, el gen del virus de la hepatitis H, un gen requerido para la duplicación del virus de la hepatitis H, el gen del virus sincitial respiratorio, un gen que se requiere para la duplicación del virus sincitial respiratorio, el gen del virus del herpes simple, un gen que se requiere para la duplicación del virus del herpes simple, el gen del citomegalovirus del herpes, un gen que se requiere para la duplicación del citomegalovirus del herpes, el gen del virus de Epstein Barr del herpes, un gen que se requiere para la duplicación del virus de Epstein Barr del herpes, el gen del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, un gen que se requiere para la duplicación del virus del herpes asociado al sarcoma de Kaposi, el gen del virus JC, el gen humano que se requiere para el virus JC, el gen del mixovirus, un gen que se requiere para la duplicación del gen del mixovirus, el gen del rinovirus, un gen que se requiere para la duplicación del rinovirus, el gen del coronavirus, un gen que se requiere para la duplicación del coronavirus, el gen del virus del Nilo Occidental, un gen que se requiere para la duplicación del virus del Nilo Occidental, el gen de la encefalitis de San Luis, un gen que se requiere para la duplicación de la encefalitis de San Luis, el gen del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, el gen del virus de la encefalitis del valle del Murray, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la encefalitis del valle del Murray, el gen del virus del dengue, un gen que se requiere para la duplicación del virus del dengue, el gen del virus 40 del simio, un gen que se requiere para la duplicación del virus 40 del simio, el gen del virus linfotrópico de células T humanas, un gen que se requiere para la duplicación del virus linfotrópico de células T humanas, el gen del virus de la leucemia murina de Moloney, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la leucemia murina de Moloney, el gen del virus de la encefalomiocarditis, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la encefalomiocarditis, el gen del virus del sarampión, un gen que se requiere para la duplicación del virus del sarampión, el gen del virus de la varicela-zóster, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la varicela-zóster, el gen del adenovirus, un gen que se requiere para la duplicación del adenovirus, el gen del virus de la fiebre amarilla, un gen que se requiere para la duplicación del virus de la fiebre amarilla, el gen del poliovirus, un gen que se requiere para la duplicación del poliovirus, el gen del poxvirus, un gen que se requiere para la duplicación del poxvirus, el gen del plasmodium, un gen que se requiere para la duplicación del gen del plasmodium, el gen de *Mycobacterium ulcerans*, un gen que se requiere para la duplicación de *Mycobacterium ulcerans*, el gen de *Mycobacterium tuberculosis*, un gen que se requiere para la duplicación de *Mycobacterium tuberculosis*, el gen de *Mycobacterium leprae*, un gen que se requiere para la duplicación de *Mycobacterium leprae*, el gen del *Staphylococcus aureus*, un gen que se requiere para la duplicación del *Staphylococcus aureus*, el gen del *Streptococcus pneumoniae*, un gen que se requiere para la duplicación del *Streptococcus pneumoniae*, el gen del *Streptococcus pyogenes*, un gen que se requiere para la duplicación del *Streptococcus pyogenes*, el gen de la *Chlamydia pneumoniae*, un gen que se requiere para la duplicación de la *Chlamydia pneumoniae*, el gen del *Mycoplasma pneumoniae*, un gen que se requiere para la duplicación del *Mycoplasma pneumoniae*, un gen de integrina, un gen de selectina, el gen del sistema del complemento, el gen de la quimiocina, el gen receptor de la quimiocina, el gen GCSF, el gen Gro1, el gen Gro2, el gen Gro3, el gen PF4, el gen MIG, el gen de la proteína básica proplaquetaria, el gen MIP-11, el gen MIP-1J, el gen RANTES, el gen MCP-1, el gen MCP-2, el gen MCP-3, el gen CMBKR1, el gen CMBKR2, el gen CMBKR3, el gen CMBKR5v, el gen AIF-1, el gen 1-309, un gen a un componente de un canal de iones, un gen a un receptor de neurotransmisores, un gen a un ligando de neurotransmisores, gen de la familia amiloide, el gen de la presenilina, el gen HD, el gen DRPLA, el gen SCA1, el gen SCA2, el gen MJD1, el gen CACNL1A4, el gen SCA7, el gen SCA8, el gen del alelo que se encuentra en las células LOH, o un gen de alelo de un gen polimórfico.

Para la administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas son administradas, preferentemente, de forma parenteral, es decir, de manera intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas son administradas de forma intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo. Para un ejemplo, véase Stadler, et al., patente estadounidense nº 5.286.634. La administración de ácido nucleico intracelular también ha sido estudiada en Straubinger, et al., *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Academic Press, Nueva York. 101:512-527 (1983); Mannino, et al., *Biotechniques* 6:682-690 (1988); Nicolau, et al., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 6:239-271 (1989), y Behr, *Acc. Chem. Res.* 26:274-278 (1993). Se describen otros métodos adicionales de administración de compuestos terapéuticos a base de lípidos, por ejemplo, en Rahman et al., patente estadounidense nº 3.993.754; Sears, patente estadounidense nº 4.145.410; Papahadjopoulos

et al., patente estadounidense nº 4.235.871; Schneider, patente estadounidense nº 4.224.179; Lenk et al., patente estadounidense nº 4.522.803; y Fountain et al., patente estadounidense nº 4.588.578.

En otros métodos, las preparaciones farmacéuticas pueden ser puestas en contacto con el tejido diana por aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación puede efectuarse por procedimientos tópicos, "abiertos" o "cerrados".
 5 Por "tópico" se quiere decir la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al entorno, tal como la piel, la orofaringe, el canal auditivo externo y similares. Procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen la incisión de la piel de un paciente y visualizar directamente el tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Generalmente, esto se logra por un procedimiento quirúrgico, tal como una traqueotomía para acceder a los pulmones, una laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales u otra aproximación
 10 quirúrgica directa al tejido diana. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos diana internos no son directamente visualizados, sino objeto de acceso mediante la inserción de instrumentos a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden ser administradas al peritoneo mediante irrigación con aguja. Asimismo, las preparaciones farmacéuticas pueden ser administradas a las meninges o a la médula espinal por infusión durante una punción lumbar seguida por la colocación apropiada del paciente, según se
 15 practica comúnmente para la anestesia raquídea o la formación de imágenes de la médula espinal con metrazamida. Alternativamente, las preparaciones pueden ser administradas a través de dispositivos endoscópicos.

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

20 Los métodos descritos en la presente memoria pueden ser puestos en práctica en diversos anfitriones. Los anfitriones preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ganado vacuno, caballos, ovejas y similares.

Las dosificaciones para las partículas de lípido-agente terapéutico descritas en la presente memoria dependerán de la proporción entre agente terapéutico y lípido y de la opinión del médico administrador basada en la edad, el peso y
 25 el estado del paciente.

En una realización, en la presente memoria se describe un método de modulación de la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Estos métodos generalmente comprenden la puesta en contacto de una célula con una partícula lipídica descrita en la presente memoria que está asociada con un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Según se usa en la presente memoria, el término "modular" se refiere a la
 30 alteración de la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. En realizaciones diferentes, modulación puede querer decir aumentar o potenciar, o puede querer decir disminuir o reducir. Se conocen y están disponibles en la técnica métodos de medición del nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana, e incluyen, por ejemplo, métodos que emplean la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) y técnicas inmunohistoquímicas. En realizaciones particulares, el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana es
 35 aumentado o reducido en al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más de un 50% en comparación con un valor de control apropiado.

Por ejemplo, si se desea una mayor expresión de un polipéptido, el ácido nucleico puede ser un vector de expresión que incluya un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. Por otro lado, si se desea una menor expresión de un polinucleótido o polipéptido, entonces el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, un
 40 ARNip o un microARN que comprenda una secuencia de polinucleótidos que se hibrida específicamente con un polinucleótido que codifica el polipéptido diana, trastocando con ello la expresión del polinucleótido o polipéptido diana. Alternativamente, el ácido nucleico puede ser un plásmido que exprese tal oligonucleótido, ARNip o microARN antisentido.

En una realización particular, en la presente memoria se describe un método de modulación de la expresión de un polipéptido por parte de una célula que comprende proporcionar a una célula una partícula lipídica que consiste o
 45 consiste esencialmente en un lípido catiónico de Fórmula I, un lípido neutro, un esteroles, un PEG de lípido modificado con PEG en una proporción molar, por ejemplo, de aproximadamente 20-65% de lípido catiónico de Fórmula I, 3-25% del lípido neutro, 15-55% del esteroles, y 0,5-15% del PEG o del lípido modificado con PEG, estando asociada la partícula lipídica con un ácido nucleico capaz de modular la expresión del polipéptido. En realizaciones particulares, la proporción molar de lípidos es aproximadamente 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5,
 50 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 40/15/40/5 o 35/15/40/10 (porcentajes molares de lípido catiónico de Fórmula I/DSPC o DPPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA). En algunas realizaciones, la partícula lipídica también incluye un resto de acceso, tal como un lípido de acceso descrito en la presente memoria (por ejemplo, la partícula lipídica consiste esencialmente en un lípido catiónico de Fórmula I, un lípido neutro, un esteroles, un PEG o un lípido modificado
 55 con PEG y un resto de acceso). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es sustituido con DPPC, POPC, DOPE o SM. En otro grupo de realizaciones, el PEG o el lípido modificado con PEG es sustituido con PEG-DSG, PEG-DMG o PEG-DPG.

En realizaciones particulares, el agente terapéutico se selecciona de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y

comprendiendo el ARNip, el microARN o el ARN antisentido un polinucleótido que se enlaza específicamente con un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo, de modo que se reduzca la expresión del polipéptido.

- 5 En otras realizaciones, el ácido nucleico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o un fragmento del mismo, de modo que aumente la expresión del polipéptido o de la variante funcional o el fragmento del mismo.

En realizaciones afines, en la presente memoria se describen reactivos útiles para la transfección de células en cultivo. Por ejemplo, las formulaciones lipídicas descritas en la presente memoria pueden ser usadas para administrar ácidos nucleicos a células cultivadas (por ejemplo, células adherentes, células de suspensión, etc.).

- 10 En realizaciones afines, en la presente memoria se describe un método de tratamiento de un trastorno o enfermedad caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, seleccionándose el agente terapéutico de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido, y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y comprendiendo el ARNip, el microARN o el ARN antisentido un polinucleótido que se enlaza específicamente con un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

- 15 En una realización, la composición farmacéutica comprende una partícula lipídica que consiste o consiste esencialmente en un lípido catiónico de Fórmula I, DSPC, colesterol y PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA en una proporción molar, por ejemplo, de aproximadamente 20-65% de lípido catiónico de Fórmula I, 3-25% del lípido neutro, 15-55% del esteroles, y 0,5-15% del PEG o del lípido modificado con PEG PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA, estando asociada la partícula lipídica con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la proporción molar de lípidos es aproximadamente 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 35/15/40/10 o 40/15/40/5 (porcentajes molares de lípido catiónico de Fórmula I/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA). En algunas realizaciones, la partícula lipídica también incluye un lípido de acceso descrito en la presente memoria (por ejemplo, la partícula lipídica consiste esencialmente en un lípido catiónico de Fórmula I, un lípido neutro, un esteroles, un PEG o un lípido modificado con PEG y un resto de acceso (por ejemplo, GalNAc3-PEG-DSG)). En algunas realizaciones, cuando el lípido de acceso incluye un resto de PEG y es añadido a una formulación liposomal existente, la cantidad de lípido modificado con PEG se reduce, de modo que la cantidad total de lípido modificado con PEG (es decir, lípido modificado con PEG, por ejemplo PEG-DMG, y el lípido de acceso que contiene PEG) se mantenga a un porcentaje molar constante (por ejemplo, 0,3%, 1,5% molar, o 3,5% molar). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es sustituido con DPPC, POPC, DOPE o SM. En otro grupo de realizaciones, el PEG o el lípido modificado con PEG es sustituido con PEG-DSG o PEG-DPG. En otra realización relacionada, en la presente memoria se describe un método de tratamiento de un trastorno o enfermedad caracterizado por la subexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en la que el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o un fragmento del mismo.

- Además, en la presente memoria se describe un método de inducción de una respuesta inmunológica en un sujeto que comprende proporcionar al sujeto la composición farmacéutica descrita en la presente memoria, en la que el agente terapéutico es un oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario. En ciertas realizaciones, la respuesta inmunológica es una respuesta inmunológica humoral o mucosa que consiste o consiste esencialmente en un lípido catiónico de Fórmula I, DSPC, colesterol y PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA en una proporción molar, por ejemplo, de aproximadamente 20-65% de lípido catiónico de Fórmula I, 3-25% del lípido neutro, 15-55% del esteroles, y 0,5-15% del PEG o del lípido modificado con PEG PEG-DMG, PEG-C-DOMG o PEG-cDMA, estando asociada la partícula lipídica con el ácido nucleico terapéutico. En realizaciones particulares, la proporción molar de lípidos es aproximadamente 60/7,5/31/1,5, 57,5/7,5/31,5/3,5, 57,2/7,1/34,3/1,4, 52/13/30/5, 50/10/38,5/1,5, 50/10/35/5, 40/10/40/10, 35/15/40/10 o 40/15/40/5 (porcentajes molares de lípido catiónico de Fórmula I/DSPC/colesterol/PEG-DMG o PEG-cDMA). En algunas realizaciones, la partícula lipídica también incluye un lípido de acceso descrito en la presente memoria (por ejemplo, la partícula lipídica consiste esencialmente en un lípido catiónico de Fórmula I, un lípido neutro, un esteroles, un PEG o un lípido modificado con PEG y un resto de acceso). En algunas realizaciones, cuando el lípido de acceso incluye un resto de PEG y es añadido a una formulación liposomal existente, se reduce la cantidad de lípido modificado con PEG de modo que la cantidad total de lípido modificado con PEG (es decir, lípido modificado con PEG; por ejemplo, PEG-DMG, y el lípido de acceso que contiene PEG) se mantenga a un porcentaje molar constante (por ejemplo, 0,3%, 1,5% molar, o 3,5% molar). En otro grupo de realizaciones, el lípido neutro en estas composiciones es sustituido con DPPC, POPC, DOPE o SM. En otro grupo de realizaciones, el PEG o el lípido modificado con PEG es sustituido con PEG-DSG o PEG-DPG. En realizaciones adicionales, la composición farmacéutica es proporcionada al sujeto en combinación con una vacuna o un antígeno. Así, en la presente memoria se proporcionan vacunas que comprenden una partícula lipídica descrita en la presente memoria, que comprende un oligonucleótido estimulante del sistema inmunitario, y también está asociada con un antígeno ante el que se desea una respuesta inmunitaria. En realizaciones particulares, el antígeno es un antígeno tumoral o está asociado con un agente infeccioso, tal como, por ejemplo, un virus, una bacteria, o un parásito.

- 60 En la técnica son muy conocidos diversos antígenos tumorales, antígenos de agentes infecciosos y antígenos asociados con otras enfermedades, y en referencias citadas en la presente memoria se describen ejemplos de los

5 mismos. Ejemplos de antígenos adecuados para su uso en la presente memoria incluyen, sin limitación, antígenos de polipéptido y antígenos de ADN. Ejemplos específicos de antígenos son los antígenos de hepatitis A, hepatitis B, viruela, polio, ántrax, gripe, tífus, tétano, sarampión, rotavirus, difteria, tosferina, tuberculosis y rubéola. En una realización, el antígeno es un antígeno recombinante de hepatitis B. En otros aspectos, el antígeno es un antígeno recombinante de hepatitis A. En otro aspecto, el antígeno es un antígeno tumoral. Ejemplos de tales antígenos asociados a tumores son el MUC-1, el antígeno EBV y los antígenos asociados con el linfoma de Burkitt. En un aspecto adicional, el antígeno es un antígeno recombinante del antígeno tumoral proteínico relacionado con la tirosinasa. Los expertos en la técnica conocen otros antígenos adecuados.

10 Los antígenos asociados a tumores, adecuados para su uso en la presente memoria incluyen moléculas tanto mutadas como no mutadas que puedan ser indicativas de un tipo monotumoral, compartidas entre varios tipos de tumores, y/o expresadas o sobreexpresadas exclusivamente en las células tumorales, en contraposición con las células normales. Además de proteínas y glicoproteínas, también se han documentado patrones de expresión, específicos a tumores, de hidratos de carbono, gangliósidos, glicolípidos y mucinas. Antígenos ejemplares asociados a tumores para ser usados en vacunas contra cánceres incluyen productos proteínicos de oncogenes, genes supresores tumorales y otros genes con mutaciones o reordenamientos exclusivos a las células tumorales, productos génicos embrionarios reactivados, antígenos oncofetales, antígenos de diferenciación específicos a tejidos (pero no específicos a tumores), receptores del factor de crecimiento, residuos de hidratos de carbono en la superficie celular, proteínas virales extrañas y varias proteínas propias adicionales.

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

35 Los patógenos incluyen, sin limitación, agentes infecciosos —por ejemplo, virus— que infectan a animales y, más en particular, a seres humanos. Ejemplos de virus infecciosos incluyen, sin limitación: retrovirus (por ejemplo, virus de inmunodeficiencia humana, tales como el VIH-1 (también denominado HTLV-III, LAV o HTLV-III/LAV, o VIH-III; y otros aislados, tales como VIH-LP; picornavirus (por ejemplo, virus de polio, virus de hepatitis A; enterovirus, virus de Coxsackie humanos, rinovirus, echovirus); Calciviridae (por ejemplo, capus que causan gastroenteritis); Togaviridae (por ejemplo, virus de la encefalitis equina, virus de la rubéola); Flaviviridae (por ejemplo, virus del dengue, virus de la encefalitis, virus de la fiebre amarilla); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Coronaviridae (por ejemplo, coronavirus); Rhabdoviridae (por ejemplo, virus de la estomatitis vesicular, virus de la rabia); Filoviridae (por ejemplo, virus del Ébola); Paramyxoviridae (por ejemplo, virus paragripales, virus de las paperas, virus del sarampión, virus sincitial respiratorio); Orthomyxoviridae (por ejemplo, virus de la gripe); Bunyaviridae (por ejemplo, virus del Hantaan, bunyavirus, phlebovirus y nairovirus); arenavirus (virus de la fiebre hemorrágica); Reoviridae (por ejemplo, reovirus, orbivirus y rotavirus); Birnaviridae; Hepadnaviridae (virus de la hepatitis B); Parvoviridae (parvovirus); Papovaviridae (virus del papiloma, virus del polioma); Adenoviridae (la mayoría de los adenovirus); Herpesviridae (virus del herpes simple (HSV) 1 y 2, virus de la varicela-zóster, citomegalovirus (CMV), virus del herpes); Poxviridae (virus variola, virus vaccinia, poxvirus); e Iridoviridae (por ejemplo, virus de la peste porcina africana); y virus no clasificados (por ejemplo, los agentes etiológicos de las encefalopatías espongiiformes, el agente de la delta hepatitis (que se cree que es un satélite defectuoso del virus de la hepatitis B), los agentes de la hepatitis no A no B (clase 1=transmitida internamente; clase 2=transmitida parenteralmente (es decir, hepatitis C); virus Norwalk y afines, y astrovirus).

55 También sirven como antígenos en animales vertebrados las bacterias gramnegativas y grampositivas. Tales bacterias grampositivas incluyen, sin limitación, las especies *Pasteurella*, las especies *Staphylococci*, y las especies *Streptococcus*. Las bacterias gramnegativas incluyen, sin limitación, *Escherichia coli*, las especies *Pseudomonas* y las especies *Salmonella*. Ejemplos específicos de bacterias infecciosas incluyen, sin limitación: *Helicobacter pylori*, *Borelia burgdorferi*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacteria* sps (por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. goodii*), *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos del grupo A), *Streptococcus agalactiae* (estreptococos del grupo B), *Streptococcus* (grupo *viridans*), *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus* (sps. anaeróbicas.), *Streptococcus pneumoniae*, *Campylobacter* sp. patógena, *Enterococcus* sp., *Haemophilus influenzae*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium* sp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella*

multocida, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptobacillus moniliformis*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenu*, *Leptospira*, *Rickettsia* y *Actinomyces israelii*.

5 Ejemplos adicionales de patógenos incluyen, sin limitación, hongos infecciosos que infectan a animales y, más en particular, a seres humanos. Ejemplos de hongos infecciosos incluyen, sin limitación: *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Chlamydia trachomatis*, *Candida albicans*. Ejemplos de parásitos infecciosos incluyen *Plasmodia* tales como *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y *Plasmodium vivax*. Otros organismos (es decir, protistas) infecciosos incluyen el *Toxoplasma gondii*.

Composiciones farmacéuticas

10 En una realización, en la presente memoria se describen composiciones farmacéuticas que comprenden un agente de ácido nucleico identificado por el modelo de detección hepática descrito en la presente memoria. La composición incluye el agente —por ejemplo, un ARNbc— y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica es útil para tratar un trastorno o enfermedad asociado con la expresión o la actividad del gen. Tales composiciones farmacéuticas son formuladas en función del modo de administración. Un ejemplo son las composiciones que se formulan para la administración sistémica mediante administración parenteral. Las composiciones farmacéuticas que incluyen el agente identificado son administradas en dosificaciones suficientes para inhibir la expresión del gen diana; por ejemplo, el gen del Factor VII. En general, una dosis adecuada del agente de ARNbc estará en el intervalo de 0,01 a 5,0 miligramos por kilogramo de peso corporal del receptor por día, generalmente en el intervalo de 1 microgramo a 1 mg por kilogramo de peso corporal por día. La composición farmacéutica puede ser administrada una vez al día, o el ARNbc puede ser administrado como dos, tres o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día o incluso usando una perfusión o administración continua mediante una formulación de liberación controlada. En ese caso, el ARNbc contenido en cada subdosis debe ser correspondientemente menor para lograr la dosificación diaria total. La unidad de dosificación también puede ser formulada para su administración a lo largo de varios días usando, por ejemplo, una formulación convencional de liberación sostenida que proporciona liberación sostenida del ARNbc en un periodo de varios días. Las formulaciones de liberación sostenida son muy conocidas en la técnica y son particularmente útiles para la administración vaginal de agentes, tal como podrían usarse con los agentes descritos en la presente memoria. En esta realización, la unidad de dosificación contiene un múltiplo correspondiente de la dosis diaria.

30 El experto en la técnica apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, sin limitación, la gravedad del trastorno o enfermedad, tratamientos anteriores, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Las estimaciones de dosificaciones efectivas y de las vidas medias *in vivo* para los ARNbc descritos en la presente memoria pueden realizarse usando metodologías convencionales o en función de ensayos *in vivo* usando un modelo animal apropiado, según se describe en la presente memoria en otro lugar.

35 En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de lípidos-ácidos nucleicos descritas en la presente memoria se preparan según técnicas estándar y comprenden, además, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Generalmente, como vehículo farmacéuticamente aceptable se empleará suero fisiológico normal. Otros vehículos adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, suero fisiológico al 0,9%, glicina al 0,3% y similares, incluyendo, para mayor estabilidad, glicoproteínas tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En composiciones que comprenden suero fisiológico u otros vehículos que contienen sal, el vehículo es añadido, preferentemente, tras la formación de la partícula lipídica. Así, después de que se forman las composiciones de lípido-ácido nucleico, las composiciones pueden ser diluidas en vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como el suero fisiológico normal.

45 Las preparaciones farmacéuticas resultantes pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas. Las soluciones acuosas pueden entonces ser envasadas para su uso o ser filtradas en condiciones asépticas y liofilizadas, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para las condiciones fisiológicas aproximadas, tales como agentes de ajuste del pH y de tamponado, agentes de ajuste de la tonicidad y similares; por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, etc. Además, la suspensión lipídica puede incluir agentes protectores de los lípidos que protegen a los lípidos de radicales libres y de daños peroxidativos de los lípidos durante su almacenamiento. Son adecuados los inhibidores de radicales libres lipófilos, tales como α -tocoferol y quelantes hidrosolubles ferroespecíficos, como la ferrioxamina.

55 La concentración de partículas lipídicas o partículas de lípido-ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente —concretamente, desde menos de aproximadamente un 0,01%, habitualmente o al menos aproximadamente 0,05-5% hasta del 10 al 30% en peso— y será seleccionada fundamentalmente por los volúmenes, las viscosidades, etc., del fluido, según el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentar para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede resultar particularmente deseable en pacientes que tengan deficiencia cardíaca congestiva asociada con aterosclerosis o

60

hipertensión severa. Alternativamente, los complejos compuestos de lípidos irritantes pueden ser diluidos para disminuir las concentraciones para aminorar la inflamación en el sitio de administración. En un grupo de realizaciones, el ácido nucleico tendrá un marcador y será usado para el diagnóstico (indicando la presencia del ácido nucleico complementario). En este caso, la cantidad de complejos administrada dependerá del marcador particular usado, del estado de la enfermedad que se diagnostica y del criterio del médico, pero generalmente estará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal (por ejemplo, del agente de ácido nucleico), preferentemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal. En algunas realizaciones un complejo administrado incluye entre aproximadamente 0,004 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal del agente de ácido nucleico (por ejemplo, entre aproximadamente 0,006 mg/kg y aproximadamente 0,2 mg/kg).

Según se ha hecho notar anteriormente, las partículas de lípido-agente terapéutico (por ejemplo, ácido nucleico) descritas en la presente memoria pueden incluir fosfolípidos modificados con polietilenglicol (PEG), lípidos modificados con PEG-ceramida o con gangliósido G_{M1} u otros lípidos efectivos para evitar o limitar la agregación. La adición de tales componentes no impide meramente la agregación de complejos. Más bien, también puede proporcionar un medio para aumentar la vida útil en circulación e incrementar la administración de la composición de lípido-ácido nucleico a los tejidos diana.

En la presente memoria también se describen composiciones de lípido-agente terapéutico en forma de *kit*. Normalmente, el *kit* comprenderá un recipiente que estará dividido en compartimentos para contener los diversos elementos del *kit*. El *kit* contendrá las partículas o las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria, preferentemente en forma deshidratada o concentrada, con instrucciones para su rehidratación o disolución y su administración. En ciertas realizaciones, las partículas comprenden el agente activo, mientras que en otras realizaciones no lo comprenden.

Las composiciones farmacéuticas que contienen un agente identificado por el modelo de detección hepática pueden ser administradas de varias maneras, dependiendo de si se desea un tratamiento local o sistémico y del área que ha de tratarse. La administración puede ser tópica, pulmonar —por ejemplo, por inhalación o insuflación de polvos o aerosoles, incluyendo mediante nebulizador—; intratraqueal, intranasal, epidérmica y transdérmica, oral o parenteral. La administración también puede estar diseñada para que tenga como resultado una ubicación preferencial en tejidos particulares a través de su administración local; por ejemplo, mediante inyección intraarticular directa en las articulaciones, mediante administración rectal para su administración directa al vientre y los intestinos, mediante administración intravaginal para su administración al cuello uterino y la vagina, mediante administración intravítrea para su administración al ojo. La administración parenteral incluye la inyección o la perfusión intravenosa, intraarterial, intraarticular, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular; o la administración intracraneal, por ejemplo, la intratecal o la intraventricular.

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas para la administración tópica pueden incluir parches transdérmicos, pomadas, lociones, cremas, geles, gotas, supositorios, aerosoles, líquidos y polvos. Pueden ser necesarios o deseables vehículos farmacéuticos convencionales, bases acuosas, en polvo u oleosas, espesantes y similares. También pueden ser útiles preservativos, guantes y similares recubiertos. Las formulaciones tópicas preferentes incluyen aquellas en las que los ARNbc aquí descritos se encuentran mezclados con un componente tópico de administración, tal como un lípido, un liposoma, un ácido graso, un éster de ácido graso, un esteroide, un agente quelante o un tensioactivo. Los lípidos y liposomas preferidos incluyen los neutros (por ejemplo, etanolamina dioleilfosfatidílica (DOPE), colina dimiristoilfosfatidílica (DMPC), colina diestearoilfosfatidílica), los negativos (por ejemplo glicerol dimiristoilfosfatidílico, o DMPG) y los catiónicos (por ejemplo dioleiltetrametilaminopropilo DOTAP y la etanolamina dioleilfosfatidílica DOTMA). Los ARNbc descritos en la presente memoria pueden ser encapsulados dentro de liposomas o pueden formar complejos con los mismos, en particular con liposomas catiónicos. Alternativamente, los ARNbc pueden ser formulados con lípidos, en particular con lípidos catiónicos. Los ácidos y los ésteres grasos preferidos incluyen, sin limitación, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido eicosanoico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato glicerílico, 1-dodecilazicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un éster alquílico C₁₋₁₀ (por ejemplo isopropilmiristato IPM), monoglicérido, diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. En la solicitud de patente estadounidense con n° de serie 09/315.298 presentada el 20 de mayo de 1999 se describen en detalle formulaciones tópicas.

Las composiciones y formulaciones para la administración oral incluyen polvos o gránulos, microparticulados, nanoparticulados, suspensiones o soluciones en agua o medios no acuosos, cápsulas, cápsulas de gel, saquitos, comprimidos o minicomprimidos. Pueden ser deseables espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de la dispersión o aglutinantes. Las formulaciones orales preferidas son aquellas en las que los ARNbc aquí descritos son administrados junto con uno o más tensioactivos potenciadores de la penetración y quelantes. Los tensioactivos preferidos incluyen ácidos grasos y/o ésteres o sales de los mismos, ácidos biliares y/o sales de los mismos. Los ácidos/sales biliares preferidos incluyen el ácido quenodesoxicólico (CDCA) y el ácido ursodesoxiciquenodesoxicólico (UDCA), el ácido cólico, el ácido deshidrocólico, el ácido desoxicólico, el ácido glucólico, el ácido glicólico, el ácido glicodesoxicólico, el ácido taurocólico, el ácido taurodesoxicólico, tauro-24,25-dihidrofusidato sódico y glicodihidrofusidato sódico. Los ácidos grasos preferidos incluyen ácido araquidónico, ácido undecanoico, ácido oleico, ácido láurico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico,

ácido linoleico, ácido linolénico, dicaprato, tricaprato, monooleína, dilaurina, 1-monocaprato glicérido, 1-dodecilazacicloheptan-2-ona, una acilcarnitina, una acilcolina, o un monoglicérido, un diglicérido o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos (por ejemplo, sódica). También son preferidas las combinaciones de potenciadores de la penetración; por ejemplo, ácidos/sales grasos en combinación con ácidos/sales biliares. Una combinación particularmente preferida es la sal sódica de ácido láurico, ácido cáprico y UDCA. Potenciadores adicionales de la penetración incluyen éter polioxietileno-9-laurílico, éter polioxietileno-20-cetilico. Los ARNbc descritos en la presente memoria pueden ser administrados oralmente en forma granular, incluyendo partículas secadas rociadas, o ser formulados formando micro o nanopartículas. Los agentes de formulación de ARNbc incluyen poliaminoácidos; poliiiminas; poli(acrilatos); polialquilacrilatos, polioxetanos, polialquilcianoacrilatos; gelatinas, albúminas, almidones, acrilatos, polietilenglicoles (PEG) y almidones cationizados; polialquilcianoacrilatos; poliiminas, polulanos, celulosas y almidones derivatizados por DEAE. Agentes de formulación particularmente preferidos incluyen quitosán, N-trimetilquitosán, poli-L-lisina, polihistidina, poliornitina, poliesperminas, protamina, polivinilpiridina, politiodietilaminometilileno P(TDAE), poliaminoestireno (por ejemplo p-amino), poli(metilcianoacrilato), poli(etilcianoacrilato), poli(butilcianoacrilato), poli(isobutilcianoacrilato), poli(isohexilcianoacrilato), DEAE-metacrilato, DEAE-hexilacrilato, DEAE-acrilamida, DEAE-albúmina y DEAE-dextrano, polimetilacrilato, polihexilacrilato, poli(ácido D,L-láctico), poli(ácido DL-láctico-co-glicólico (PLGA)), alginato y polietilenglicol (PEG). En las solicitudes estadounidenses con nº de serie 08/886.829 (presentada el 1 de julio de 1997), con nº de serie 09/108.673 (presentada el 1 de julio de 1998), con nº de serie 09/256.515 (presentada el 23 de febrero de 1999), con nº de serie 09/082.624 (presentada el 21 de mayo de 1998) y con nº de serie 09/315.298 (presentada el 20 de mayo de 1999) se describen con detalle formulaciones orales para los ARNbc y su preparación.

Las composiciones y formulaciones para la administración parenteral, intratecal o intraventricular pueden incluir soluciones acuosas estériles que pueden contener tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados tales como, sin limitación, potenciadores de la penetración, compuestos vehiculares y otros vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Las composiciones farmacéuticas incluyen, sin limitación, soluciones, emulsiones y formulaciones que contienen liposomas. Estas composiciones pueden ser generadas a partir de diversos componentes que incluyen, sin limitación, líquidos preformados, sólidos autoemulsionantes y semisólidos autoemulsionantes.

Las composiciones farmacéuticas que pueden ser convenientemente presentadas en forma posológica unitaria pueden ser preparadas según técnicas convencionales bien conocidas en la industria farmacéutica. Tales técnicas incluyen la etapa de asociar los ingredientes activos con el o los vehículos o excipientes farmacéuticos. En general, las formulaciones son preparadas asociando uniforme e íntimamente los ingredientes activos con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y luego, si es necesario, dando forma al producto.

Las composiciones pueden ser formuladas en cualquiera de muchas formas posológicas posibles, tal como, sin limitación, comprimidos, cápsulas, cápsulas de gel, jarabes líquidos, geles blandos, supositorios y enemas. Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden ser formuladas como suspensiones en medios acuosos, no acuosos o mixtos. Las suspensiones acuosas pueden contener, además, sustancias que aumentan la viscosidad de la suspensión, incluyendo, por ejemplo, carboximetilcelulosa sódica, sorbitol y/o dextrano. La suspensión también puede contener estabilizantes.

En una realización, las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas y usadas como espumas. Las espumas farmacéuticas incluyen formulaciones tales como, sin limitación, emulsiones, microemulsiones, cremas, jaleas y liposomas. Aunque básicamente de naturaleza similar, estas formulaciones varían en los componentes y la consistencia del producto final. La preparación de tales composiciones y formulaciones es generalmente conocida por los expertos en las técnicas farmacéutica y de formulación y puede ser aplicada a la formulación de las composiciones descritas en la presente memoria.

La fraseología y terminología usada en la presente memoria tiene un fin de descripción y no debería considerarse que sea limitante. El uso de "incluir", "comprender", o "tener", "contener", "implicar" y variaciones de los mismos en la presente memoria, está pensado para abarcar los elementos enumerados posteriormente y equivalentes de los mismos, así como elementos adicionales.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son ofrecidos para ilustrar, pero no para limitar la invención reivindicada.

Según se usa en los Ejemplos aquí proporcionados, el término "ApoE" se refiere a la ApoE3, a no ser que se identifique de otra forma.

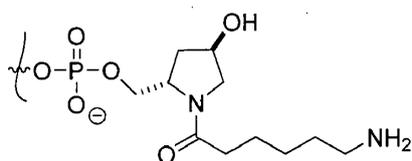
Ejemplo 1: Dobletes de ARNip para la selección de Luc y FVII como dianas

La Tabla 8, a continuación, proporciona secuencias ejemplares para la selección de Luc y FVII como dianas.

55

Tabla 8.

Doblete	Sentido/Antisentido	Secuencia 5'-3'	Diana
	1000/2434	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT	Luc
	2433/1001	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
	2433/2434	C*UfU ACG CUG AGfU ACU UCG AdT*dT U*CG AAG fUAC UCA GCG fUAA GdT*dT	Luc
	1000/1001	CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT	Luc
AD-1596		GGAUCAUCUCAAGUCUUACdTdT GUAAGACUUGAGAUGAUCCdTdT	FVII
AD-1661		GGAfUfCAfUfCfUfCAAGfUfCfUfUAfCdTsdT GfUAAGAfCfUfUGAGAfUGAfUfCfCdT*dT	FVII



Observación: L8 es C^*UfU la minúscula es un nucleótido modificado con 2'-O-metilo, * son enlaces de la cadena principal de fosforotioato, fN es un 2'-fluoro nucleótido, dN es un 2'-desoxi nucleótido.

Ejemplo 2: Evaluación de FVII *in vivo* usando los liposomas derivados del lípido catiónico

5 **Experimentos *in vivo* de silenciamiento del Factor VII y ApoB en roedores.** Ratones C57BL/6 (Charles River Labs, Massachusetts) y ratas Sprague-Dawley (Charles River Labs, Massachusetts) recibieron ya fuera suero fisiológico o ARNip en formulaciones deseadas mediante inyección en la vena caudal con un volumen de 0,01 mL/g. En diversos momentos posteriores a la administración, los animales fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano y se tomaron muestras de su sangre en tubos con separación de suero por sangrado retroorbital. Los niveles séricos de la proteína Factor VII fueron determinados en las muestras usando un ensayo cromogénico (Coaset Factor VII, DiaPharma Group, Ohio o Biophen FVII, Aniara Corporation, Ohio) según protocolos del fabricante. Se generó una curva estándar usando suero recogido de animales tratados con suero fisiológico. En experimentos en los que se evaluaron los niveles de ARNm hepático, en diversos momentos posteriores a la administración, los animales fueron sacrificados y se recogió y congeló su hígado instantáneamente en nitrógeno líquido. El tejido hepático congelado se molió hasta convertirlo en polvo. Se prepararon lisados tisulares y se determinaron los niveles de Factor VII y *apoB* del ARNm hepático usando un ensayo de ADN ramificado (QuantiGene Assay, Panomics, California).

Ejemplo 3. Formulaciones liposomales para la selección de FVII como diana

20 El Factor VII (FVII), proteína prominente en la cascada de coagulación, es sintetizado en el hígado (hepatocitos) y segregado al plasma. Los niveles de FVII en el plasma pueden ser determinados mediante un simple ensayo colorimétrico en placa. Como tal, el FVII representa un modelo conveniente para determinar la regulación a la baja arbitrada por ARNip de proteínas derivadas de hepatocitos, así como para monitorizar las concentraciones en el plasma y la distribución tisular de las partículas lipídicas de ácido nucleico y ARNip.

Eliminación del Factor VII en ratones

25 La actividad del FVII fue evaluada en animales tratados con FVII ARNip 24 horas después de una inyección intravenosa (en bolo) en ratones C57BL/6. El FVII fue medido usando un juego de reactivos disponible comercialmente para determinar los niveles proteínicos en suero o tejido, siguiendo las instrucciones del fabricante a escala de microplaca. La reducción del FVII fue determinada en relación con ratones de control no tratados, y los resultados se expresaron como porcentaje de FVII residual. Se usaron cuatro niveles de dosis (2, 5, 12,5, 25 mg/kg de FVII ARNip) en la detección inicial de cada composición liposomal novedosa, y esta dosificación fue expandida en estudios subsiguientes en función de los resultados obtenidos en la detección inicial.

Determinación de la tolerabilidad

Se evaluó la tolerabilidad de cada formulación novedosa de ARNip liposomal monitorizando el cambio de peso, observaciones junto a la jaula, la química clínica y, en algunos casos, la hematología. Los pesos de los animales fueron anotados antes del tratamiento y 24 horas después del tratamiento. Los datos fueron anotados como cambio porcentual del peso corporal. Además de las mediciones del peso corporal, se obtuvo un panel químico completamente clínico, incluyendo marcadores de la función hepática, a cada nivel de dosis (2, 5, 12,5 y 25 mg/kg de ARNip) 24 horas después de la inyección usando una parte alícuota del suero recogido para el análisis de FVII. Se enviaron muestras al Central Laboratory for Veterinarians (Langley, Columbia Británica) para su análisis. En algunos casos, se incluyeron ratones adicionales en el grupo de tratamiento para permitir la recogida de sangre completa para el análisis hematológico.

Determinación del índice terapéutico

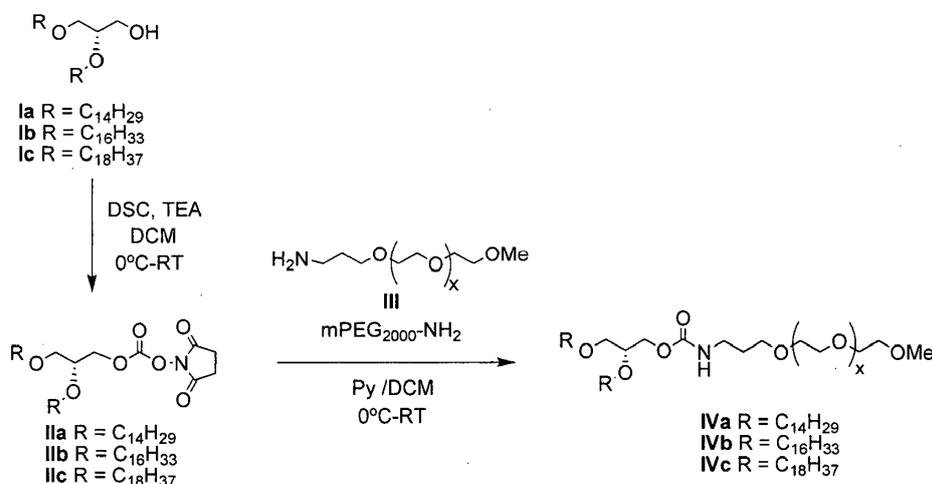
El índice terapéutico (TI) es un parámetro arbitrario generado comparando medidas de toxicidad y actividad. Para estos estudios, el TI fue determinado como:

$$TI = MTD(\text{máxima dosis tolerada}) / ED_{50}(\text{dosis para un silenciamiento génico del 50\% del FVII})$$

La MTD para estos estudios se estableció como la menor dosis que causaba una disminución >7% en el peso corporal y un aumento >200 veces en alanina aminotransferasa (ALT), un marcador de química clínica con buena especificidad para la lesión hepática en roedores. La ED₅₀ fue determinada desde curvas de dosis-actividad de FVII.

Se administró ARNip AD 1661, proporcionado en el Ejemplo 1, en formulaciones que comprenden la siguiente proporción molar de DLin-M-C3-DMA:DSPC:colesterol:PEG-DMG, que se prepararon y se sometieron a ensayo en los métodos descritos en el Ejemplo 2: 60:7,5:31:1,5; 50:10:38,5:1,5; y 40:20:38,5:1,5. Los resultados de estos experimentos *in vivo* son proporcionados en la FIG. 1, demostrando la capacidad de silenciamiento de las formulaciones sometidas a ensayo.

Ejemplo 4. Preparación de 1,2-di-O-alkilo-sn3-carbamoilglicérido (PEG-DMG)



Preparación de IVa

Se pusieron 1,2-di-O-tetradecil-sn-glicérido **Ia** (30 g, 61,80 mmol) y *N,N'*-succinimidilcarbonato (DSC, 23,76 g, 1,5eq) en diclorometano (DCM, 500 mL) y se agitaron en una mezcla de agua y hielo. Se añadió trietilamina (TEA, 25,30 mL, 3 eq) a la solución en agitación y, posteriormente, se permitió que la mezcla de reacción se agitara a temperatura ambiente de un día para otro. El avance de la reacción fue monitorizado mediante TLC. La mezcla de reacción fue diluida con DCM (400 mL) y la capa orgánica fue lavada con agua (2x500 mL), una solución acuosa de NaHCO₃ (500 mL) seguido por un tratamiento de extracción estándar. El residuo obtenido se secó a temperatura ambiente a vacío elevado durante la noche. Después de secar el carbonato **IIa** en bruto así obtenido fue disuelto en diclorometano (500 mL) y agitado sobre un baño helado. A la solución en agitación, se añadieron, bajo argón, mPEG₂₀₀₀-NH₂ (**III**, 103,00 g, 47,20 mmol, adquirido en NOF Corporation, Japón) y piridina anhidra (Py, 80 mL, sobrante). A continuación, se dejó que la mezcla de reacción se agitara a temperatura ambiente de un día para otro. Los disolventes y las sustancias volátiles fueron eliminados al vacío y el residuo fue disuelto en DCM (200 mL) y cargado en una columna de gel de sílice lleno de acetato etílico. La columna se eluyó inicialmente con acetato etílico y posteriormente con un gradiente de 5-10% de metanol en diclorometano para proporcionar el lípido de PEG **IVa** deseado como un sólido blanco (105,30 g, 83%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,20-5,12(m, 1H), 4,18-4,01(m, 2H), 3,80-3,70(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH₂-

CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,10-2,01(m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,56-1,45(m, 4H), 1,31-1,15(m, 48H), 0,84(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo MS hallado: 2660-2836.

Preparación de IVb

5 Se pusieron juntos 1,2-di-O-hexadecil-*sn*-glicérido **Ib** (1,00 g, 1,848 mmol) y DSC (0,710 g, 1,5eq) en diclorometano (20 mL) y se enfriaron hasta 0°C en una mezcla de agua con hielo. Se añadió trietilamina (1,00 mL, 3eq) y la reacción fue agitada durante la noche. La reacción fue seguida por TLC, diluida con DCM, lavada con agua (2 veces) y solución de NaHCO₃ y secada sobre sulfato sódico. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida y el residuo resultante de **Ib** fue mantenido a un vacío elevado durante la noche. Este compuesto fue usado directamente para la siguiente reacción sin purificación adicional. Se disolvieron MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50g, 0,687 mmol, adquirido en NOF Corporation, 10 Japón) y **Ib** (0,702g, 1,5eq) en diclorometano (20 mL) bajo argón. La reacción fue enfriada hasta 0°C. Se añadió piridina (1 mL, sobrante) y la reacción fue agitada durante la noche. La reacción fue monitorizada por TLC. Los disolventes y las sustancias volátiles fueron eliminados al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía (primero, acetato etílico, seguido por 5-10% MeOH/DCM como gradiente de elución) para obtener el compuesto **IVb** requerido como un sólido blanco (1,46 g, 76%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,17(t, J= 5,5Hz, 1H), 4,13(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,05(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,82-3,75(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,05-1,90(m, 15 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45(m, 6H), 1,35-1,17(m, 56H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo MS hallado: 2716-2892.

Preparación de IVc

20 Se pusieron juntos 1,2-di-O-octadecil-*sn*-glicérido **Ic** (4,00 g, 6,70 mmol) y DSC (2,58 g, 1,5eq) en diclorometano (60 mL) y se enfriaron hasta 0°C en una mezcla de agua con hielo. Se añadió trietilamina (2,75 mL, 3eq) y la reacción fue agitada durante la noche. La reacción fue seguida por TLC, diluida con DCM, lavada con agua (2 veces) y solución de NaHCO₃, y secada sobre sulfato sódico. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida y el residuo fue mantenido a un vacío elevado durante la noche. Este compuesto fue usado directamente para la siguiente reacción sin purificación adicional. Se disolvieron MPEG₂₀₀₀-NH₂ **III** (1,50g, 0,687 mmol, adquirido en NOF Corporation, Japón) y **Ic** (0,760g, 1,5eq) en diclorometano (20 mL) bajo argón. La reacción fue enfriada hasta 0°C. Se añadió piridina (1 mL, sobrante) y la reacción fue agitada durante la noche. La reacción fue monitorizada por TLC. Los disolventes y las sustancias volátiles fueron eliminados al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía (acetato etílico seguido por 5-10% MeOH/DCM como gradiente de elución) para obtener el compuesto **IVc** deseado como un sólido blanco (0,92 g, 48%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,22-5,15(m, 1H), 4,16(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,06(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,75(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,60-1,48(m, 4H), 1,31-1,15(m, 64H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo MS hallado: 2774-2948.

Ejemplo 5: Preparación de DLin-M-C3-DMA (es decir, (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il 4-(dimetilamino)butanoato)

35 Se agitó a temperatura ambiente durante la noche una solución de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol (0,53 g), clorhidrato de ácido 4-N,N-dimetilaminobutírico (0,51 g), 4-N,N-dimetilaminopiridina (0,61g) y clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,53 g) en diclorometano (5 mL). La solución fue lavada con ácido clorhídrico diluido seguido por bicarbonato sódico acuoso diluido. Las fracciones orgánicas fueron secadas sobre sulfato de magnesio anhidro, filtradas, y el disolvente fue eliminado en un evaporador rotatorio. El residuo se pasó a una columna de gel de sílice (20 g) usando un gradiente de elución de 1-5% metanol/diclorometano. Las fracciones que contenían el producto purificado fueron combinadas y el disolvente eliminado, dando un aceite incoloro (0,54 g).

40 Los compuestos descritos en la presente memoria pueden ser sintetizados mediante los procedimientos descritos en las siguientes monografías:

1. Schlueter, Urs; Lu, Jun; Fraser-Reid, Bert. **Synthetic Approaches To Heavily Lipidated Phosphoglyceroinositides**. *Organic Letters* (2003), 5(3), 255-257.
2. King, J. F.; Allbutt, A. D. *Can. J. Chem.* 1970, 48, 1754-1769.
3. Mach, Mateusz; Schlueter, Urs; Mathew, Felix; Fraser-Reid, Bert; Hazen, Kevin C. **Comparing n- pentenyl orthoesters and n- pentenyl glycosides as alternative glycosyl donors**. *Tetrahedron* (2002), 58(36), 7345-7354.

Ejemplo 6: Eficacia de liposomas MC3 que tienen diversas composiciones liposomales en ratas

50 Para examinar la respuesta a la dosis de formulaciones liposomales que contienen MC3 en ratas, se prepararon las siguientes formulaciones liposomales esencialmente según se describe en el Ejemplo 2. Según se proporcionan en la tabla que sigue, los componentes incluido se indican como sigue: MC3-DSPC-colesterol-PEG-C14. La siguiente Tabla 9 proporciona formulaciones ejemplares según se sometieron a ensayo.

Animales Sprague-Dawley
Total 27
Vol. iny. (uL) Inyección de 5 uL/g

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	3				5		PBS
2	3	FVII	1661	0,06	5	0,30	50-10-38,5-1,5
3	3	FVII	1661	0,02	5	0,10	50-10-38,5-1,5
4	3	FVII	1661	0,006	5	0,03	50-10-38,5-1,5
5	3	FVII	1661	0,002	5	0,01	50-10-38,5-1,5
6	3	FVII	1661	0,06	5	0,30	40-15-40-5
7	3	FVII	1661	0,02	5	0,10	40-15-40-5
8	3	FVII	1661	0,006	5	0,03	40-15-40-5
9	3	FVII	1661	0,002	5	0,01	40-15-40-5

Según se muestra en la FIG. 2, la formulación liposomal que tiene un 50% molar de MC3 presentó una curva de respuesta a la dosificación con eficacia a concentraciones de ARNip ligeramente menores que la de la formulación liposomal que tenía un 40% molar de MC3.

Ejemplo 7: Eficacia de liposomas MC3 que muestran dependencia de la ApoE en ratones

- 5 Para examinar adicionalmente el papel de la ApoE en la eficacia de diversas formulaciones liposomales, se administraron a ratones de la forma natural y con inhibición de la ApoE liposomas MC3 que contenían la composición ARNip AD-1661, a 0,1, 0,03 y 0,01 mg/kg, esencialmente según se describe en el Ejemplo 2. La mitad de las formulaciones liposomales fueron mezcladas de antemano con proteína ApoE recombinante para determinar si la adición exógena de ApoE puede superar la ausencia de la proteína en ratones.
- 10 La siguiente Tabla 10 muestra formulaciones ejemplares según se sometieron a ensayo.

Tabla 10

Plan experimental

Animales C57BL/6 y con inhibición de ApoE

Total 42

Vol. iny. (uL) variable, en función del peso

Grupo	Tamaño del grupo	Tipo de ratón	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	3	C57BL/6				0,00	PBS
2	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0100	0,100	MC3 50-10-38,5-1,5 con ApoE
3	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0030	0,030	MC3 50-10-38,5-1,5 con ApoE
4	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 con ApoE
5	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0100	0,100	MC3 50-10-38,5-1,5 sin ApoE
6	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0030	0,030	MC3 50-10-38,5-1,5 sin ApoE
7	3	C57BL/6	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 sin ApoE
8	3	con inhibición de ApoE				0,00	PBS
9	3	con inhibición de ApoE	FVII	1661	0,0100	0,100	MC3 50-10-38,5-1,5 con ApoE

Grupo	Tamaño del grupo	Tipo de ratón	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
10	3	con inhibición de ApoE	FVII	1661	0,0030	0,030	MC3 50-10-38,5-1,5 con ApoE
11	3	con inhibición de ApoE	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 con ApoE
12	3	con inhibición de ApoE	FVII	1661	0,0100	0,100	MC3 50-10-38,5-1,5 sin ApoE
13	3	con inhibición de ApoE	FVII	1661	0,0030	0,030	MC3 50-10-38,5-1,5 sin ApoE
14	3	con inhibición de ApoE	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 sin ApoE

La FIG. 3 muestra la atenuación, dependiente de la dosis, de los niveles de la proteína FVII en ratones de la forma natural (barras de la derecha), pero no de ratones deficientes por inhibición de la ApoE (barras de la izquierda) cuando se les administran liposomas formulados con MC3, lo que sugiere un papel de la ApoE en la captación y/o el suministro celulares al hígado. Los liposomas MC3 formulados según se ha descrito anteriormente con el ARNip 1661 fueron administrados a concentraciones de 0,1, 0,03 y 0,01 mg/kg por sí solo o mezclado de antemano con lipoproteína ApoE. A dosis mucho mayores (por ejemplo, ~ 1,0 mg/kg o superiores), sin embargo, se descubrió que las formulaciones formuladas con MC3 arbitraban el silenciamiento del ARNm FVII y de la proteína (no mostrado). Según se muestra en la FIG. 3, las formulaciones liposomales formuladas con MC3 sometidas a ensayo son incapaces de arbitrar el silenciamiento de FVII en ratones con inhibición de ApoE, a no ser que sean mezcladas de antemano con ApoE recombinante. Así, pudo rescatarse la actividad en ratones con inhibición de ApoE mezclando de antemano MC3 (un liposoma que contenía MC3) con ApoE.

Ejemplo 8: Eficacia de formulaciones liposomales que contienen MC3 que varían en el porcentaje molar y la longitud de la cola de las fosfocolinas

Para examinar el efecto de variaciones en el porcentaje molar y la longitud de la cola de las fosfocolinas en la eficacia de diversas formulaciones liposomales, se sometió a ensayo a diversas formulaciones que comprendían DSPC, DMPC y DLPC en busca de la eficacia del silenciamiento de FVII a 0,01 o 0,03 mg/kg.

La siguiente Tabla 11 muestra formulaciones ejemplares según se sometieron a ensayo:

Plan experimental

Animales	C57BL/6
Total	45
Vol. iny. (uL)	variable, en función del peso

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	3				0,00	PBS
2	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 1661 DSPC
3	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 50-10-38,5-1,5 1661 DSPC
4	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 1661 DMPC
5	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 50-10-38,5-1,5 1661 DMPC
6	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 50-10-38,5-1,5 1661 DLPC
7	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 50-10-38,5-1,5 1661 DLPC
8	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 40-20-38,5-1,5 1661 DSPC
9	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 40-20-38,5-1,5 1661 DSPC
10	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 40-20-38,5-1,5 1661 DMPC
11	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 40-20-38,5-1,5 1661 DMPC
12	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 40-20-38,5-1,5 1661 DLPC

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
13	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 40-20-38,5-1,5 1661 DLPC
14	3	FVII	1661	0,0010	0,010	MC3 30-30-38,5-1,5 1661 DMPC
15	3	FVII	1661	0,0003	0,003	MC3 30-30-38,5-1,5 1661 DMPC

La FIG. 4 muestra los efectos de los cambios en el porcentaje molar del MC3 comparando, por ejemplo, 50 y 40% molares, y, para el caso de una formulación que contiene DMPC, 50, 40 y 30% molares. La FIG. 4 también muestra el efecto de cambios en el lípido neutro, que muestra los diferentes resultados para las formulaciones liposomales de MC3 que comprenden DSPC, DMPC y DLPC.

5 **Ejemplo 9: Incorporación de lípidos GalNAc en las formulaciones liposomales.**

Para explorar potenciales mecanismos de administración alternativa, se realizaron experimentos *in vivo* usando formulaciones liposomales que comprendían lípidos conjugados con N-acetilo galactosamina (GalNAc). Se escogió GalNAc como posible ligando de acceso, pues se cree que el receptor GalNAc está altamente expresado en el hígado. Por lo tanto, se realizaron estudios en ratones y ratas para someter a ensayo la eficacia de las formulaciones liposomales que contenían MC3 que, además, comprendían el lípido GalNAc3-PEG-DSG de Fórmula III esencialmente según se describe en el Ejemplo 2. En todos los experimentos, la cantidad total de lípidos conjugados con PEG se mantuvo constante (por ejemplo, cuando se añadió un 0,5% molar de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG disminuyó en un 0,5% molar). En el experimento, cuatro animales fueron usados para cada uno de los nueve grupos por genotipo.

15 La siguiente Tabla 12 proporciona detalle experimental para los métodos, que incluye liposomas que contienen MC3 que tienen una concentración de PEG-lípido del 5%, habiéndose sometido las formulaciones a ensayo en ratones C57BL6. Los liposomas comprendían las siguientes cantidades molares relativas: 50/10/35/5 de MC3/DSPC/colesterol/PEG-DSG. Cuando se añade un 0,5% de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG se reduce hasta el 4,5%.

20 **Tabla 12**

Plan experimental

Animales C57BL6

Total 36

Vol. iny. (uL) variable, en función del peso

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	4				10		PBS
2	4	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/5
3	4	FVII	1661	0,05	10	0,50	50/10/35/5
4	4	FVII	1661	0,025	10	0,25	50/10/35/5
5	4	FVII	1661	0,0125	10	0,125	50/10/35/5
6	4	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
7	4	FVII	1661	0,05	10	0,50	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
8	4	FVII	1661	0,025	10	0,25	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
9	4	FVII	1661	0,0125	10	0,125	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc

25 La siguiente Tabla 13 proporciona detalle experimental para los métodos, que incluye liposomas que contienen MC3 que tienen una concentración de lípido PEG-DSG del 10%, habiéndose sometido las formulaciones a ensayo en ratones C57BL6. Los liposomas comprendían las siguientes cantidades molares relativas: 50/10/30/10 de MC3/DSPC/colesterol/PEG-DSG. Cuando se añade un 0,5% de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG se reduce hasta el 9,5%.

Tabla 13

Plan experimental

Animales C57BL6

Total 36

Vol. iny. (uL) variable, en función del peso

Grupo	Tamaño grupo	del	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	4					10		PBS
2	4		FVII	1661	0,5	10	5,00	50/10/30/10
3	4		FVII	1661	0,25	10	2,50	50/10/30/10
4	4		FVII	1661	0,125	10	1,25	50/10/30/10
5	4		FVII	1661	0,0625	10	0,625	50/10/30/10
6	4		FVII	1661	0,5	10	5	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc
7	4		FVII	1661	0,25	10	2,50	50/10/30/9,5 con 0,5% de GalNAc
8	4		FVII	1661	0,125	10	1,25	50/10/30/9,5 con 0,5% de GalNAc
9	4		FVII	1661	0,0625	10	0,63	50/10/30/9,5 con 0,5% de GalNAc

La FIG. 5, muestra los efectos, en los que aumentar la protección con PEG disminuye los silencios no arbitrados con GalNAc en ratones C57BL6. Esto se demuestra con concentraciones de PEG tanto del 5% como del 10% en ratones C57BL6. La inclusión de C18-PEG (es decir, PEG-DSG) al 10% molar inhibe de manera efectiva el silenciamiento, que puede ser superado sustituyendo el 0,5% molar del PEG-lípido con una cantidad equimolar de GalNAc-lípido (es decir, GalNAc3-PEG-DSG de Fórmula III). Por lo tanto, aumentar la protección con PEG (por ejemplo, del 5% molar al 10% molar) parece disminuir el silenciamiento no arbitrado por GalNAc, pero también la potencia total.

También se llevaron a cabo experimentos similares en ratas, en los que el PEG-lípido (también PEG-DSG) fue incluido en los liposomas tanto al 5 como al 10% molares. La siguiente Tabla 14 proporciona detalle experimental para los métodos que incluyen liposomas que contienen MC3 que tienen una concentración de PEG-lípido del 5%, habiéndose sometido las formulaciones a ensayo en ratas. Los liposomas comprendían las siguientes cantidades molares relativas: 50/10/35/5 de MC3/DSPC/colesterol/PEG-DSG. Cuando se añade un 0,5% de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG se reduce hasta el 4,5%.

Tabla 14

Plan experimental

Animales Ratas Sprague-Dawley

Total 36

Vol. iny. (uL) Inyección en bolo

Grupo	Tamaño grupo	del	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	4					5		PBS
2	4		FVII	1661	0,2	5	1,00	50/10/35/5
3	4		FVII	1661	0,1	5	0,50	50/10/35/5
4	4		FVII	1661	0,05	5	0,25	50/10/35/5
5	4		FVII	1661	0,025	5	0,125	50/10/35/5

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
6	4	FVII	1661	0,2	5	1,00	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
7	4	FVII	1661	0,1	5	0,50	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
8	4	FVII	1661	0,05	5	0,25	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
9	4	FVII	1661	0,025	5	0,125	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc

La siguiente Tabla 15 proporciona detalle experimental para los métodos que incluyen liposomas que contienen MC3 que tienen una concentración de PEG-lípido del 10%, habiéndose sometido las formulaciones a ensayo en ratas. Los liposomas comprendían las siguientes cantidades molares relativas: 50/10/30/10 de MC3/DSPC/colesterol/PEG-DSG. Cuando se añade un 0,5% de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG se reduce hasta el 9,5%.

5 Tabla 15

Plan experimental

Animales Sprague-Dawley

Total 36

Vol. iny. (uL) Inyección en bolo

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	4				5		PBS
2	4	FVII	1661	1	5	5,00	50/10/30/10
3	4	FVII	1661	0,5	5	2,50	50/10/30/10
4	4	FVII	1661	0,25	5	1,25	50/10/30/10
5	4	FVII	1661	0,125	5	0,625	50/10/30/10
6	4	FVII	1661	1	5	5,00	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc
7	4	FVII	1661	0,5	5	2,50	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc
8	4	FVII	1661	0,25	5	1,25	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc
9	4	FVII	1661	0,125	5	0,625	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc

10 La FIG. 6 muestra resultados de formulaciones de MC3 que contienen C18 PEG a un 5% molar y un 10% molar administradas a ratas a las dosis indicadas. Las formulaciones que contienen un 10% molar de PEG-DSG muestran poco silenciamiento a las concentraciones sometidas a ensayo (0,625 - 5 mg/kg) en ratas. Sin embargo, la inclusión de un 0,5% molar de GalNAc3-PEG-DSG de Fórmula III (es decir, sustituyendo el 0,5% molar del C18-PEG), restaura la inhibición del FVII. Por lo tanto, cuando se la compara con los ratones, en la rata, una formulación más protegida generalmente retiene mejor la potencia, según se muestra en las diferencias entre las concentraciones de PEG del 5% molar y el 10% molar.

15 Ejemplo 10: Evaluación de las variaciones del porcentaje molar de componentes en las formulaciones liposomales que contienen MC3 con y sin inclusión de un 0,5% molar de GalNAc3-PEG-DSG

Para determinar la eficacia de los liposomas que contienen MC3 que tienen diferente porcentaje molar de los componentes, con y sin GalNAc3-PEG-DSG, las siguientes formulaciones liposomales fueron preparadas y sometidas a ensayo en ratones C57BL6, sustancialmente según se ha descrito en el anterior Ejemplo 2. Los componentes, según se representa en la tabla, son proporcionados en el orden que sigue: MC3/DSPC/colesterol/PEG-DSG. Cuando se

añade un 0,5% de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG se reduce hasta el 4,5%, como se muestra en la Tabla 16 a continuación.

Tabla 16

Animales C57BL6
 Total 33
 Vol. iny. (uL) variable, en función del peso

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	3				10		PBS
2	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/5
3	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/35/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
4	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	40/15/40/5
5	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	40/15/40/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
6	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	30/25/40/5
7	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	30/25/40/4,5 con 0,5% de lípido GalNAc
8	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	20/35/40/5
9	3	FVII	1661	0,1	10	1,00	20/35/40/4,5 con 0,5% de GalNAc-lípido

- 5 Según se muestra en la FIG. 7, la adición de la GalNAc a las formulaciones liposomales mejora el silenciamiento de FVII en cada formulación, es decir, en la cual MC3 está presente a un 50, 40 y 30% molares.

Ejemplo 11: Eficacia de los liposomas que contienen MC3 y GalNAc en ratones de la forma natural y ASGPR KO

- 10 Para examinar el papel de la ASGPR en la eficacia de diversas formulaciones liposomales, se administró a ratones de la forma natural y con inhibición de la ASGPR liposomas MC3 que contenían la composición AD-1661 de ARNip a 3, 1 y 0,3 mg/kg, según se ha descrito en el Ejemplo 1. Los componentes, según se representan en la tabla, son proporcionados en el orden que sigue: MC3/DSPC/colesterol/PEG-DSG. Cuando se añade un 0,5% de GalNAc3-PEG, la correspondiente cantidad de PEG-DSG se reduce hasta el 9,5%, según se muestra en la Tabla 17 a continuación.

Tabla 17

Plan experimental
 Animales C57BL6 y ASGPr KO
 Total 25 + 15
 Vol. iny. (uL) variable, en función del peso

15

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
1	5				10		PBS
2	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/10
3	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc
4	5	FVII	1661	0,1	10	1,00	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc

Grupo	Tamaño del grupo	Diana	ARNip	Conc. (mg/mL)	Vol. iny. (uL/g)	Dosis (mg/kg)	Vehículo
5	5	FVII	1661	0,03	10	0,300	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc
6	5				10		PBS
7	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/10
8	5	FVII	1661	0,3	10	3,00	50/10/30/9,5 con 0,5% de lípido GalNAc

La FIG. 8 muestra los resultados de estos experimentos, demostrando que la restauración de la inhibición de FVII en las formulaciones que contienen C18 PEG por la inclusión del lípido GalNAc3-PEG-DSG queda abolida cuando son administradas en una cepa murina deficiente en el receptor asialoglicoproteína (ASGPR), que es el receptor previsto para el resto de acceso GalNAc.

5 Ejemplo 12: Síntesis de oligonucleótidos

Síntesis

Todos los oligonucleótidos son sintetizados en un sintetizador AKTAoligopilot. Para la síntesis de oligonucleótidos se usaron un soporte sólido de vidrio poroso controlado disponible comercialmente (dT-CPG, 500', Prime Synthesis) y fosforamiditas de ARN con grupos protectores estándar, 5'-O-dimetoxitritilo N6-benzoil-2'-*t*-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritilo N4-acetil-2'-*t*-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita, 5'-O-dimetoxitritilo N2--isobutil-2'-*t*-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita y 5'-O-dimetoxitritilo 2'-*t*-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilfosforamidita (Pierce Nucleic Acids Technologies). Las 2'-F fosforamiditas, la 5'-O-dimetoxitritilo N4-acetil-2'-fluro-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetil-fosforamidita y la 5'-O-dimetoxitritilo 2'-fluro-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetil-fosforamidita se adquieren en Promega. Todas las fosforamiditas se usan a una concentración de 0,2M en acetonitrilo (CH₃CN), salvo la guanosina, que se usa a una concentración de 0,2M en THF/ANC al 10% (v/v). Se usa un tiempo de acoplamiento/reciclado de 16 minutos. El activador es tiotetrazol 5-etílico (0,75M, American International Chemicals); para la oxidación de PO se usa yodo/agua/piridina, y para la oxidación de PS se usa PADS (2%) en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).

Las cadenas conjugadas con el ligando 3' son sintetizadas usando un soporte sólido que contiene el correspondiente ligando. Por ejemplo, la introducción de la unidad de colesterol en la secuencia se lleva a cabo partiendo de una fosforamidita de hidroxiprolinol-colesterol. El colesterol se une a *trans*-4-hidroxiprolinol a través de un enlace 6-aminohexanoato para obtener un resto de hidroxiprolinol-colesterol. Se sintetizan ARNip marcados en el extremo 5' con Cy-3 y Cy-5.5 (fluoróforo) a partir de la correspondiente fosforamidita Quasar-570 (Cy-3) adquirida en Biosearch Technologies. La conjugación de ligandos al extremo 5' y/o a una posición interna se logra usando un bloque funcional de ligando-fosforamidita protegido de manera apropiada. Se efectúa un acoplamiento prolongado de 15 minutos de solución 0,1 M de fosforamidita en CH₃CN anhidro en presencia de activador de 5-(etililo)-1*H*-tetrazol con un oligonucleótido ligado al soporte sólido. La oxidación del fosfito internucleótido al fosfato se lleva a cabo usando yodo-agua según se ha documentado (1), o mediante tratamiento con hidroperóxido *terc*-butílico/acetoneitrilo/agua (10: 87: 3) con un tiempo de espera de oxidación de 10 minutos del oligonucleótido conjugado. El fosforotioato se introduce por la oxidación de fosfito a fosforotioato usando un reactivo de transferencia de azufre, tal como DDTT (adquirido en AM Chemicals), PADS y/o reactivo de Beaucage. La fosforamidita de colesterol se sintetiza en las propias instalaciones y es usada a una concentración de 0,1 M en diclorometano. El tiempo de acoplamiento para la fosforamidita de colesterol es 16 minutos.

35 Desprotección I (desprotección de nucleobases)

Después de la finalización de la síntesis, el soporte es transferido a un frasco de vidrio (VWR) de 100 mL. El oligonucleótido es escindido del soporte con desprotección simultánea de los grupos de base y fosfato con 80 mL de una mezcla de amoniaco etanólico [amoniaco:etanol (3:1)] durante 6,5 horas a 55°C. El frasco es enfriado brevemente en hielo y luego la mezcla de amoniaco etanólico es filtrada al interior de un nuevo frasco de 250 mL. El CPG se lava con 2 porciones de 40 mL de etanol/agua (1:1 v/v). A continuación, el volumen de la mezcla es reducido a ~ 30 mL mediante evaporador rotatorio. Acto seguido, la mezcla es congelada sobre hielo seco y secada al vacío en una centrífuga Speed-Vac.

Desprotección II (eliminación del grupo 2'-TBDMS)

El residuo secado es resuspendido en 26 mL de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA•3HF) o piridina-HF y DMSO (3:4:6) y calentado a 60°C durante 90 minutos para eliminar los grupos de *terc*-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. A continuación, la reacción es apagada con 50 mL de acetato sódico 20 mM y el pH se ajusta a 6,5. El oligonucleótido se almacena en un congelador hasta su purificación.

agua y hielo. Se añadió trietilamina (25,30 mL, 3eq) a la solución en agitación y, posteriormente, se dejó que la mezcla de reacción fuera agitada a temperatura ambiente durante la noche. El avance de la reacción fue monitorizado por TLC. La mezcla de reacción fue diluida con DCM (400 mL) y la capa orgánica se lavó con agua (2×500 mL) y solución acuosa de NaHCO₃ (500 mL), seguido por un tratamiento de extracción estándar. El residuo obtenido fue secado durante la noche a temperatura ambiente a un vacío elevado. Después de secar el carbonato **2a** en bruto así obtenido, fue disuelto en diclorometano (500 mL) y agitado sobre un baño de hielo. A la solución en agitación, se añadieron, bajo argón, mPEG₂₀₀₀-NH₂ (**3**, 103,00 g, 47,20 mmol, adquirido en NOF Corporation, Japón) y piridina anhidra (80 mL, sobrante). En algunas realizaciones, la metoxi-(PEG)_x-amina tiene una x= de 45-49, preferentemente 47-49, y, más preferentemente, 49. A continuación, se dejó que la mezcla de reacción fuera agitada durante la noche a temperatura ambiente. Los disolventes y las sustancias volátiles fueron eliminados al vacío y el residuo fue disuelto en DCM (200 mL) y cargado en una columna de gel de sílice lleno de acetato etílico. La columna fue eluida inicialmente con acetato etílico y, posteriormente, con gradiente de 5-10% de metanol en diclorometano para dar el PEG-lípido **4a** deseado como un sólido blanco (105,30g, 83%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,20-5,12(m, 1H), 4,18-4,01(m, 2H), 3,80-3,70(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,10-2,01(m, 2H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,56-1,45(m, 4H), 1,31-1,15(m, 48H), 0,84(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo MS hallado: 2660-2836.

Preparación de 4b: Se juntaron 1,2-di-O-hexadecil-*sn*-glicérido **1b** (1,00 g, 1,848 mmol) y DSC (0,710 g, 1,5eq) en diclorometano (20 mL) y se enfriaron hasta 0°C en una mezcla de agua con hielo. A eso se añadió trietilamina (1,00 mL, 3eq) y se agitó de un día para otro. La reacción fue seguida por TLC, diluida con DCM, lavada con agua (2 veces) y solución de NaHCO₃ y secada sobre sulfato sódico. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida y el residuo **2b** fue mantenido a un vacío elevado durante la noche. Este compuesto fue usado directamente para la siguiente reacción sin purificación adicional. Se disolvieron en diclorometano (20 mL), bajo argón, MPEG₂₀₀₀-NH₂ **3** (1,50g, 0,687 mmol, adquirido en NOF Corporation, Japón) y el compuesto **2b** de la etapa anterior (0,702g, 1,5eq). La reacción fue enfriada hasta 0°C. A eso se añadió piridina (1 mL, sobrante) y se agitó durante la noche. La reacción fue monitorizada por TLC. Los disolventes y las sustancias volátiles fueron eliminados al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía (primero, acetato etílico, luego 5-10% de MeOH/DCM como gradiente de elución) para obtener el compuesto **4b** requerido como un sólido blanco (1,46 g, 76%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,17(t, J= 5,5Hz, 1H), 4,13(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,05(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,82-3,75(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 2,05-1,90(m, 2H), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,61-1,45(m, 6H), 1,35-1,17(m, 56H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo MS hallado: 2716-2892.

Preparación de 4c: Se juntaron 1,2-di-O-octadecil-*sn*-glicérido **1c** (4,00 g, 6,70 mmol) y DSC (2,58 g, 1,5eq) en diclorometano (60 mL) y se enfriaron hasta 0°C en una mezcla de agua con hielo. A eso se añadió trietilamina (2,75 mL, 3eq) y se agitó durante la noche. La reacción fue seguida por TLC, diluida con DCM, lavada con agua (2 veces) y solución de NaHCO₃ y secada sobre sulfato sódico. Los disolventes fueron eliminados a presión reducida y el residuo fue mantenido a un vacío elevado durante la noche. Este compuesto fue usado directamente para la siguiente reacción sin purificación adicional. Se disolvieron en diclorometano (20 mL), bajo argón, MPEG₂₀₀₀-NH₂ **3** (1,50g, 0,687 mmol, adquirido en NOF Corporation, Japón) y el compuesto **2c** de la etapa anterior (0,760g, 1,5eq). La reacción fue enfriada hasta 0°C. A eso se añadió piridina (1 mL, sobrante) y se agitó durante la noche. La reacción fue monitorizada por TLC. Los disolventes y las sustancias volátiles fueron eliminados al vacío y el residuo fue purificado por cromatografía (primero, acetato etílico, luego 5-10% de MeOH/DCM como gradiente de elución) para obtener el compuesto **4c** requerido como un sólido blanco (0,92 g, 48%). RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,22-5,15(m, 1H), 4,16(dd, J= 4,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 4,06(dd, J= 5,00Hz, 11,00 Hz, 1H), 3,81-3,75(m, 2H), 3,70-3,20(m, -O-CH₂-CH₂-O-, PEG-CH₂), 1,80-1,70 (m, 2H), 1,60-1,48(m, 4H), 1,31-1,15(m, 64H), 0,85(t, J= 6,5Hz, 6H). Intervalo MS hallado: 2774-2948.

Ejemplo 14: Protocolo general para el método de extrusión

Los lípidos (lípidos catiónicos de Fórmula I, DSPC, colesterol, DMG-PEG) son solubilizados y mezclados en etanol según la proporción molar deseada. Los liposomas se forman por medio de un etanol método de inyección de etanol, en la que los lípidos mezclados son añadidos a un tampón acetato sódico a un pH de 5,2. Esto da lugar a la formación espontánea de liposomas en etanol al 35%. Los liposomas son extrudidos a través de una membrana de policarbonato de 0,08 μm al menos 2 veces. Se preparó una solución madre de ARNip en acetato sódico y etanol al 35% y se la añadió al liposoma que había de cargarse. La solución de ARNip-liposoma fue incubada a 37°C durante 30 minutos y, posteriormente, diluida. Se eliminó el etanol y se lo intercambió con tampón PBS mediante diálisis o filtración por flujo tangencial.

Ejemplo 15: Protocolo general para el método de mezclado en línea

Se preparan soluciones madre individuales y separadas, conteniendo una lípidos y la otra ARNip. Se prepara lípidos madre que contiene lípidos catiónicos de Fórmula I, DSPC, colesterol y PEG-lípidos mediante disolución en etanol al 90%. El 10% restante es tampón citrato de bajo pH. La concentración del lípidos madre es de 4 mg/mL. El pH de este tampón citrato puede oscilar entre un pH de 3-5, dependiendo del tipo de lípidos fusogénico empleado. El ARNip también se disuelve en tampón citrato a una concentración de 4 mg/mL. A pequeña escala, se preparan 5 mL de cada solución madre.

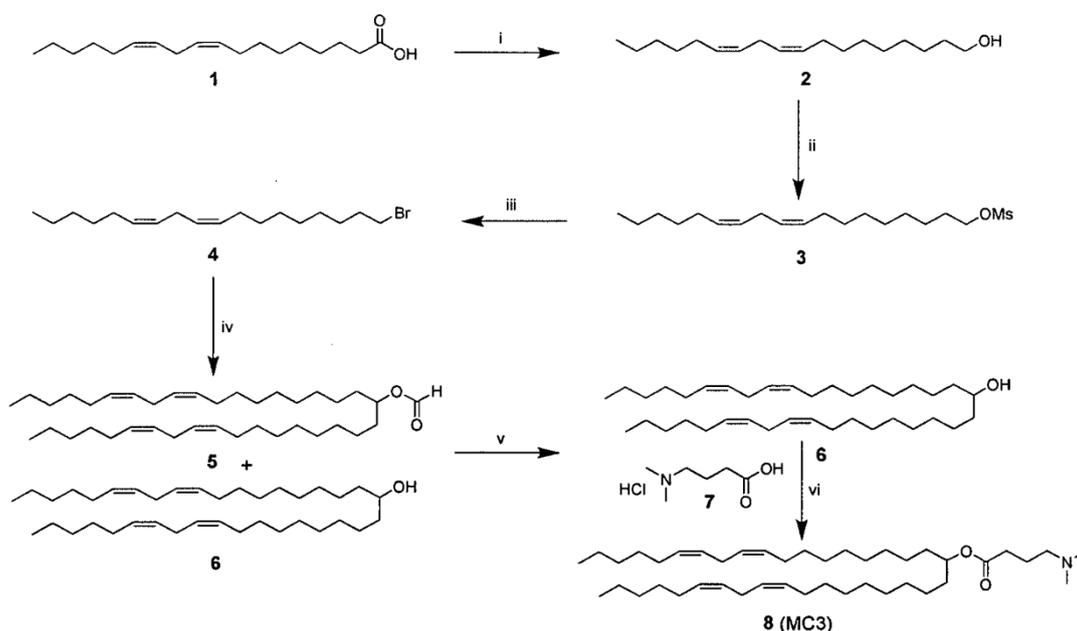
Las soluciones madre son completamente transparentes, y los lípidos deben estar completamente disueltos antes de combinarse con el ARNip. Por lo tanto, las soluciones madre pueden ser calentadas para que solubilicen

completamente los lípidos. Los ARNip usados en el procedimiento deben ser oligonucleótidos modificados o no modificados, y pueden estar conjugados con restos lipófilos tales como colesterol.

Las soluciones madre individuales se combinan bombeando cada solución a un conector en T. Se usa una bomba Watson-Marlow de doble altura de elevación para controlar simultáneamente el inicio y la parada de las dos corrientes.

- 5 Un tubo de polipropileno se reduce adicionalmente de tamaño, hasta un tubo de 0,8 mm, para aumentar el caudal lineal. Las conducciones de polipropileno (DI = 0,8 mm) se conectan a cada lado de un conector en T. La T de polipropileno tiene un borde lineal de 1,6 mm para un volumen resultante de 4,1 mm³. Cada uno de los extremos grandes (1,6 mm) de la conducción de polipropileno es metido en tubos de ensayo que contienen ya sea la solución madre de lípido disuelto o el ARNip disuelto. Tras el conector en T se coloca un solo tubo, por el que manará la corriente combinada. El tubo se extiende a continuación a un recipiente con un volumen 2× de PBS. El PBS es agitado rápidamente. El caudal para la bomba se encuentra en un reglaje de 300 rpm o 110 mL/min. Se retira el etanol y se lo intercambia con PBS mediante diálisis. A continuación, las formulaciones lipídicas son concentradas usando centrifugación o diafiltración hasta una concentración operativa apropiada.

- 15 **Ejemplo 16: Síntesis de [6Z,9Z,28Z,31Z]-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ol-4-(dimetilamino)butanoato] (un lípido catiónico de Fórmula I o MC3)**



i) Vitruro/THF; ii) MsCl, Et₃N, DMAP/DCM; iii) LiBr/DMF; iv) Mg, HCOOEt; v) NaOH, THF, agua; vi) ECCL, DMAP, DIPEA

Preparación del alcohol 2

- Se cargó un reactor limpio y seco de vidrio de 200L dotado de una entrada de argón y un termopozo con 60 L de THF y 5,73 kg (20,4 moles) de ácido linoleico. El contenido del reactor se enfrió por debajo de 0°C usando un baño de hielo seco de acetona. A esta solución fría se añadieron lentamente 13,8 L de vitruro (60% peso/volumen) en tolueno manteniendo la temperatura interna de la mezcla de reacción por debajo de 0°C (Nota: la adición inicial de vitruro fue exotérmica y se observó espuma. La formación de espuma cesó después de 15 minutos de adición). La adición de vitruro llevó 3 horas y 45 minutos. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se tomó una parte alícuota y se apagó con Na₂SO₄ saturado, y el producto en bruto así obtenido fue analizado por TLC para determinar la presencia del ácido de partida. La TLC mostró la finalización de la reacción y la mezcla de reacción se enfrió de nuevo por debajo de 0°C en aproximadamente 45 minutos. Se añadió lentamente a la mezcla de reacción una solución saturada de sulfato sódico (preparada disolviendo 1,1 Kg de sulfato sódico en 1,5 L de agua) durante 45 minutos. Una vez completada la adición, se añadieron 25 L de acetato etílico durante un periodo de 30 minutos con agitación. La mezcla de reacción obtenida fue filtrada a través de un lecho de celita durante un periodo de 45 minutos y el lecho de celita se lavó con 17 L adicionales de acetato etílico para eliminar todo el producto del residuo. Los compuestos orgánicos combinados se concentraron a presión reducida. El residuo se disolvió en 15 L de acetato etílico y la capa orgánica fue lavada con agua (2 × 7 L) y secada sobre sulfato sódico (1,1 kg). Después de la filtración, la capa orgánica se concentró a presión reducida y se secó a alto vacío para obtener el producto de alcohol linoleílico como un aceite. Rendimiento bruto = 5,5 kg (rendimiento teórico = 5,43 kg). Este producto se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente.

35

Procedimiento de preparación del mesilato linoleílico 3

Se cargó un reactor limpio y seco de vidrio de 200 L dotado de una entrada de argón y un termopozo con 45 L de DCM y 5,5 kg del producto bruto de la etapa 1. A esta solución se le añadieron 11,5 L de trietilamina seguido de 0,252 kg (2,0 moles) de DMAP. La solución se enfrió a -10°C usando una mezcla de hielo seco y acetona, y, a esta masa de reacción fría, se añadió gota a gota una solución de cloruro mesílico (3,2 L, 41,3 moles) en DCM (10 L) durante un periodo de 3 horas mientras se mantenía la temperatura por debajo de 0°C. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 hora, después de lo cual la TLC (EtOAc al 5% en DCM, tinción con PMA) de la mezcla de reacción mostró la desaparición completa del alcohol de partida. A la mezcla de reacción, se añadieron 17 L de agua helada y las capas se separaron. La capa acuosa superior se lavó de nuevo con 10 L de DCM y las capas se separaron. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con 2 × 10 L de ácido clorhídrico diluido (preparado mezclando 2 L de HCl concentrado con 18 L de agua filtrada por OI), 2 × 7,5 L de agua y 10 L de salmuera (preparada disolviendo 11 kg de NaCl en 10 L de agua filtrada por OI). La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄ (2,75 kg) y se filtró. La capa orgánica se evaporó a presión reducida y se secó al vacío, obteniendo el mesilato bruto como un aceite amarillo claro. Rendimiento bruto = 7,1 kg (rendimiento teórico = 7,1 kg). Este material se usó sin purificación adicional en la etapa siguiente. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,42-5,21 (m, 4H), 4,20 (t, 2H), 3,06 (s, 3H), 2,79 (t, 2H), 2,19-2,00 (m, 4H), 1,90-1,70 (m, 2H), 1,06-1,18 (m, 18H), 0,88 (t, 3H). RMN ¹³C (CDCl₃) δ = 130,76, 130,54, 128,6, 128,4, 70,67, 37,9, 32,05, 30,12, 29,87, 29,85, 29,68, 29,65, 29,53, 27,72, 27,71, 26,15, 25,94, 23,09, 14,60. MS. Peso molecular calculado para C₁₉H₃₆O₃S, calculado 344,53, encontrado 343,52 (M-H).

Preparación del bromuro linoleílico 4

Se cargó un reactor limpio y seco de vidrio de 200 L dotado de entrada de argón y termopozo con 25 L de DMF y 7,1 kg del producto bruto de la etapa 2. Esta mezcla se enfrió hasta -10°C con una mezcla de hielo seco y acetona. A esta mezcla agitada, se añadió una solución de bromuro de litio (2,7 kg, 31,0 mol) en 25 L de DMF durante un periodo de 1,5 horas mientras se mantenía la temperatura de reacción por debajo de 0°C. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se agitó a 45°C durante 18-20 horas hasta que la TLC (EtOAc al 10% en hexanos, tinción con PMA) de una parte alícuota mostró la desaparición completa del mesilato de partida. La mezcla de reacción se diluyó con 70 L de agua y se extrajo con 57 L de hexanos. La capa acuosa se extrajo adicionalmente con 2 × 10 L de hexanos y las capas orgánicas combinadas (aproximadamente 120 L) se lavaron nuevamente con 2 × 10 L de agua y 1 × 10 L de salmuera (preparada disolviendo 14 kg de cloruro sódico en 10 L de agua). La capa orgánica obtenida (120 L) se secó sobre sulfato sódico (4 kg) y se concentró a presión reducida para obtener el producto bruto (6,5 kg). El producto bruto fue purificado por cromatografía en columna usando gel de sílice en malla 60-120 usando hexanos como eluyente. La concentración del producto puro proporcionó 5,5 kg (81%, tres etapas) del bromuro 4 como un líquido incoloro. RMN ¹H (CDCl₃, 400 MHz) δ = 5,41-5,29 (m, 4H), 4,20 (d, 2H), 3,40 (t, J = 7 Hz, 2H), 2,77 (t, J = 6,6 Hz, 2H), 2,09-2,02 (m, 4H), 1,88-1,00 (m, 2H), 1,46-1,27 (m, 18H), 0,88 (t, J = 3,9 Hz, 3H). RMN ¹³C (CDCl₃) δ = 130,41, 130,25, 128,26, 128,12, 34,17, 33,05, 31,75, 29,82, 29,57, 29,54, 29,39, 28,95, 28,38, 27,42, 27,40, 25,84, 22,79, 14,28.

Preparación del dilinoleilmetanol 6

Se desgasificó y purgó con argón un reactor limpio y seco de 20 L, todo de vidrio, dotado de una entrada de argón, un condensador de reflujo y termopozo. El reactor se cargó con 277 g (11,3 moles) de magnesio activado seguido de 1,5 L de éter anhidro. El reactor se desgasificó de nuevo tres veces y se purgó con argón. El bromuro 4 (2,5 kg, 7,6 moles) se disolvió en 5 L de éter anhidro bajo argón y se añadió 1 L de esta solución al reactor seguido de 25 mL (0,35 moles) de dibromometano. El contenido del reactor se calentó hasta 40°C usando un baño de agua (se observó eferescencia seguida de reflujo, lo cual indicaba el inicio de la formación del reactivo de Grignard). Después del inicio de la reacción, el calentamiento se eliminó del reactor y los 4 L restantes del bromuro se añadieron lentamente durante un periodo de 2 horas y 30 minutos manteniendo un reflujo suave de la mezcla. Una vez completada la adición, la mezcla de reacción se calentó de nuevo a reflujo (temperatura del baño 45°C) durante 1 hora, después de lo cual se apagó una parte alícuota de la mezcla de reacción con agua y se analizó mediante TLC (Hexanos, tinción de PMA) que mostró el total consumo del bromuro de partida. La mezcla de reacción se enfrió por debajo de 10°C usando un baño de hielo y se añadió una solución de formiato de etilo (275 mL en 4 L de éter) en éter durante un periodo de 2 horas y 30 minutos y, después de la finalización de la adición de la mezcla de reacción, se la calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. La mezcla de reacción se enfrió de nuevo hasta 10°C y se añadió lentamente acetona (1,15 L) a la mezcla, seguido de la adición de 7 L de agua helada y una solución de ácido sulfúrico al 10% (preparada diluyendo 3,4 L de ácido sulfúrico con 34 L de agua helada). El producto se extrajo con 3 × 10 L de éter y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 10 L de salmuera y se secaron sobre sulfato sódico (2 kg). La concentración de la capa orgánica a presión reducida proporcionó el producto bruto (2 kg) como una mezcla del alcohol dilinoleílico requerido junto con cantidades menores de producto O-formilado. Este producto bruto fue redisoluelto en THF (4 L) cargado en el reactor de vidrio de 20 L. A esto se añadió una solución de NaOH (0,934 kg disueltos en 8 L de agua helada) y el contenido se calentó a 65°C durante 18 horas, después de lo cual la TLC (10% de éter en hexanos) mostró la completa conversión del producto O-formilado en el dilinoleilmetanol requerido. La mezcla de reacción se enfrió y se extrajo con éter (3 × 4 L) y las capas orgánicas combinadas se lavaron con 5 L de salmuera y se secaron sobre sulfato sódico (4 kg). La filtración seguida de la concentración de la capa orgánica proporcionó el producto bruto. El producto bruto así obtenido se purificó por cromatografía en columna usando gel de sílice en malla 60-120 usando éter al 4% en hexanos. La concentración de las fracciones de producto puro proporcionó el 6 puro (1,45 kg, 80%) como un líquido incoloro. RMN (400 MHz, CDCl₃) δ 5,47-5,24 (m, 8H), 3,56 (dd, J = 6,8, 4,2, 1H), 2,85-2,66 (m, 4H), 2,12-1,91 (m, 9H), 1,50-

1,17 (m, 46H), 0,98-0,76 (m, 6H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃) δ 130,41, 130,37, 128,18, 128,15, 77,54, 77,22, 76,91, 72,25, 37,73, 31,75, 29,94, 29,89, 29,83, 29,73, 29,58, 29,53, 27,46, 27,43, 25,89, 25,86, 22,80, 14,30.

Preparación de [6Z,9Z,28Z,31Z]-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-il-4-(dimetilamino) butanoato] MC3 (8)

5 El metanol dinoleílico **6** (144 g, 272 mmol) fue disuelto en 1 L de diclorometano y se le añadió la sal clorhidrato del ácido dimetilaminobutírico **7** (55 g, 328 mmol) seguido de diisopropiletilamina (70 mL) y DMAP (4 g). Después de agitar durante 5 minutos a temperatura ambiente, se añadió EDCI (80 g, 417 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche, después de lo cual el análisis de TLC (gel de sílice, MeOH al 5% en CH₂Cl₂) mostró la desaparición completa del alcohol de partida. La mezcla de reacción se diluyó con CH₂Cl₂ (500 mL) y se lavó con NaHCO₃ saturado (400 mL), agua (400 mL) y salmuera (500 mL). Las capas orgánicas combinadas se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y los disolventes se eliminaron al vacío. El producto bruto (180 g) así obtenido se purificó mediante cromatografía en columna de resolución rápida [2,5 kg de gel de sílice, usando los siguientes eluyentes i) columna llena con 6 L de NEt₃ al 0,1% en DCM; después de cargar ii) 4 L de NEt₃ al 0,1% en DCM; iii) 16 L de MeOH al 2% - 98% de NEt₃ al 0,1% en DCM; iv) 4 L de MeOH al 2,5% - 97,5% de NEt₃ al 0,1% en DCM; v) 12 L de MeOH al 3% - 97% de NEt₃ al 0,1% en DCM] para aislar el producto puro **8** (MC3, 159 g, 91%) como un aceite incoloro. RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃): δ 5,46-5,23 (m, 8H), 4,93-4,77 (m, 1H), 2,83-2,66 (m, 4H), 2,37-2,22 (m, 4H), 2,20 (s, 6H), 2,10-1,96 (m, 9H), 1,85-1,69 (m, 2H), 1,49 (d, J = 5,4, 4H), 1,39-1,15 (m, 39H), 0,95-0,75 (m, 6H). RMN ¹³C (101 MHz, CDCl₃): δ 173,56, 130,38, 130,33, 128,17, 128,14, 77,54, 77,22, 76,90, 74,44, 59,17, 45,64, 34,36, 32,69, 31,73, 29,87, 29,76, 29,74, 29,70, 29,56, 29,50, 27,44, 27,41, 25,84, 25,55, 23,38, 22,78, 14,27. EI-MS (+ve): PM calculado para C₄₃H₇₉NO₂ (M⁺ H)⁺: 642,6, encontrado: 642,6.

20 Ejemplo 17. Formulación de ARNip que usa vesículas formadas de antemano

Se prepararon partículas que contenían lípidos catiónicos usando el método de vesículas formadas de antemano. Se disolvieron en etanol el lípido catiónico, DSPC, colesterol y el PEG-lípido a una proporción molar de 40/10/40/10, respectivamente. La mezcla lipídica fue añadida a un tampón acuoso (50 mM de citrato, pH 4) mezclando hasta una concentración final de etanol y lípidos del 30% (vol/vol) y 6,1 mg /mL, respectivamente, y se dejó equilibrar a temperatura ambiente durante 2 minutos antes de su extrusión. Los lípidos hidratados se extrudieron a través de dos filtros de tamaño de poro de 80 nm apilados (Nuclepore) a 22°C usando un extrusor Lipex (Northern Lipids, Vancouver, Columbia Británica) hasta que se obtuvo un diámetro de vesícula de 70-90 nm, determinado por análisis Nicomp. Esto generalmente requería 1-3 pasadas. Para algunas mezclas de lípidos catiónicos que no formaban vesículas pequeñas, hidratar la mezcla de lípidos con un tampón de pH inferior (50 mM de citrato, pH 3) para protonar el grupo fosfato en el grupo funcional DSPC contribuyó a formar vesículas estables de 70-90 nm.

El FVII ARNip (disuelto en una solución acuosa de 50mM de citrato, pH 4 que contenía etanol al 30%) fue añadido a las vesículas, preequilibradas a 35°C, a una velocidad de ~5mL/min con mezcla. Una vez lograda una proporción diana final de ARNip/lípido de 0,06 (p/p), la mezcla se incubó durante otros 30 minutos a 35°C para permitir la reorganización de las vesículas y la encapsulación del FVII ARNip. A continuación, se eliminó el etanol y el tampón externo fue sustituido con PBS (155 mM de NaCl, 3 mM de Na₂HPO₄, 1mM de KH₂PO₄, pH 7,5) mediante diálisis o diafiltración de flujo tangencial. La proporción final ARNip encapsulado/lípido se determinó después de la eliminación del ARNip no encapsulado usando columnas de centrifugación de exclusión de tamaño o columnas de centrifugación de intercambio iónico. En la Figura 9 se ilustra la curva de respuesta a la dosis que ilustra el porcentaje de FVII residual con respecto a la dosis (mg/kg).

40 Ejemplo 18. Determinación del pK_a de un lípido catiónico de Fórmula I

El pK_a del lípido catiónico de Fórmula I se determinó esencialmente como se describe (Eastman et al 1992 *Biochemistry* 31: 4262-4268) usando la sonda fluorescente de ácido 2- (p-toluidino)-6-naftalenosulfónico (TNS), que no es fluorescente en el agua pero se vuelve apreciablemente fluorescente cuando se une a membranas. Se diluyeron vesículas compuestas de lípido catiónico/DSPC/CH/PEG-c-DOMG (proporción molar 40:10:40:10) hasta 0,1 mM en tampones (130mM de NaCl, 10mM de CH₃COONH₄, 10mM de MES, 10mM de HEPES) de diversos pH, que oscilaban de 2 a 11. Se añadió una parte alícuota de la solución acuosa de TNS (1 μM final) a las vesículas diluidas y, después de un período de equilibrio de 30 segundos, se midió la fluorescencia de la solución que contenía TNS a las longitudes de onda de excitación y emisión de 321 nm y 445 nm, respectivamente. El pK_a de las vesículas que contenían el lípido catiónico se determinó trazando la fluorescencia medida en función del pH de las soluciones y encajando los datos en una curva sigmoideal usando el programa comercial de gráficos IgorPro. En la figura 10 se muestra la curva de valoración de pK_a para el lípido catiónico de Fórmula I.

Lista de secuencias

<110> CHEN, JIANXIN
 ANSELL, STEVEN
 55 AKINC, AKIN
 DORKIN, JOSEPH ROBERT
 QIN, XIAOJUN
 CANTLEY, WILLIAM

MANOHARAN, MUTHIAH
 RAJEEV, KALLANTHOTTATHIL G.
 NARAYANANNAIR, JAYAPRAKASH K.
 JAYARAMAN, MUTHUSAMY

- 5 <120> FORMULACIÓN LIPÍDICA
 <130> A2038-718210
 <140> 12/813,448
 <141> 2010-06-10
 <150> 61/244,834
 10 <151> 2009-09-22
 <150> 61/185,800
 <151> 2009-06-10
 <160> 79
 <170> PatentIn version 3.5
- 15 <210> 1
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
 <400> 1
 cuuacgcuga guacuucgat t 21
- 25 <210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
 <400> 2
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21
- 35 <210> 3
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
 <220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Methyl nucleotide
 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 50 <223> 2'-O-Metil nucleótido

- <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(8)
 <223> 2'-O-Metil nucleótido
- 5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-O-Metil nucleótido
- 10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(17)
 <223> 2'-O-Metil nucleótido
- 15 <220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosforotioato
- <400> 3
 cuuacgcuga guacuucgat t 21
- 20 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 25 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- 30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-O-Metil nucleótido
- <220>
 <221> base_modificada
 <222> (11)..(11)
 <223> 2'-O-Metil nucleótido
- 35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-O-Metil nucleótido
- 40 <220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosforotioato
- <400> 4
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21
- 45 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

- <400> 5
ggaucaucuc aagucuuact t 21
- <210> 6
<211> 21
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
10 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- <400> 6
guaagacuug agaugaucct t 21
- <210> 7
<211> 21
15 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
20 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- <220>
<221> base_modificada
<222> (3)..(4)
<223> 2'-Fluoro nucleótido
- 25 <220>
<221> base_modificada
<222> (6)..(9)
<223> 2'-Fluoro nucleótido
- <220>
30 <221> base_modificada
<222> (13)..(16)
<223> 2'-Fluoro nucleótido
- <220>
35 <221> base_modificada
<222> (18)..(18)
<223> 2'-Fluoro nucleótido
- <220>
<221> base_modificada
<222> (20)..(21)
40 <223> Enlace fosforotioato
- <400> 7
ggaucaucuc aagucuuact t 21
- <210> 8
<211> 21
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
50 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- <220>
<221> base_modificada

<222> (1)..(1)
 <223> 2'-Fluoro nucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 5 <222> (6)..(8)
 <223> 2'-Fluoro nucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 10 <222> (13)..(13)
 <223> 2'-Fluoro nucleótido

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(18)
 <223> 2'-Fluoro nucleótido

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (20) .. (21)
 <223> Enlace fosforotioato

20 <400> 8
 gaaagacuug agaugaucct t 21

<210> 9
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 9
 taacgttgag gggcat 16

30 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 10
 ttccatgacg ttctgacgt 20

<210> 11
 <211> 19
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 45 <222> (8)..(8)
 <223> citosina metilada

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 50 <223> citosina metilada

<400> 11
 tccatgacgt tctgacgt 19

<210> 12
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(4)

10 <223> citosina metilada

<400> 12
 taacgttgag gggcat 16

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 13
 20 tccatgacgt tctgacgt 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (8)..(8)

30 <223> citosina metilada

<220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(17)
 <223> citosina metilada

35 <400> 14
 tccatgacgt tctgacgt 20

<210> 15
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 15
 taagcatacg ggggtg 16

45 <210> 16
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 16
 gatgctgtgt cggggtctcc gggc 24

<210> 17
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 17
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

10 <210> 18
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> citosina metilada

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (5)..(5)
 <223> citosina metilada

25 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (13)..(13)
 <223> citosina metilada

30 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (21)..(21)
 <223> citosina metilada

<400> 18
 tcgctgtttt gtcgttttgt cgtt 24

35 <210> 19
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 19
 tccaggactt ctctcaggtt 20

<210> 20
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 20
 tctcccagcg tgcgcat 18

50 <210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 21
 tgcattcccc aggccacat 20

5 <210> 22
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 22
 gcccaagctg gcatccgtca 20

15 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 23
 gcccaagctg gcatccgtca 20

25 <210> 24
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30 <400> 24
 ggtgctcact gcggc 15

35 <210> 25
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 25
 aaccgttgag gggcat 16

45 <210> 26
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 26
 tatgctgtgc cggggtcttc gggc 24

55 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 27
 gtgccggggt cttcgggc 18
 <210> 28
 <211> 18
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 28
 10 ggaccctcct ccggagcc 18
 <210> 29
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 29
 tcctccggag ccagact 18
 <210> 30
 20 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 25 <400> 30
 aacgttgagg ggcatt 15
 <210> 31
 <211> 15
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 31
 ccgtgtcat gctcc 15
 35 <210> 32
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 40 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 32
 cagcctggct caccgccttg g 21
 <210> 33
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 <400> 33
 50 cagccatggt tcccccaac 20

- <210> 34
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 34
 gttctcgctg gtagttca 20
- 10 <210> 35
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 15 <400> 35
 tctcccagcg tgcgcat 18
- <210> 36
 <211> 15
 <212> ADN
- 20 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 36
 gtgctccatt gatgc 15
- 25 <210> 37
 <211> 33
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- 30 <400> 37
 gaguucugau gaggccgaaa ggccgaaagu cug 33
- <210> 38
 <211> 15
 <212> ADN
- 35 <213> Secuencia artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 38
 aacgttgagg ggcatt 15
- 40 <210> 39
 <211> 16
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
- 45 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 39
 caacgttatg gggaga 16
- 50 <210> 40
 <211> 4

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 40
 Glu Ala Leu Ala
 1

<210> 41
 <211> 29
 <212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 41
 Ala Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
 1 5 10 15

Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
 20 25

15 <210> 42
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético

20 <400> 42
 Ala Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ala Ala Gly Gly Cys
 20 25 30

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 43
 Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Glu Ala
 30 1 5 10 15

<210> 44
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Virus Influenza A

35 <400> 44
 Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
 1 5 10 15

Met Ile Trp Asp Tyr Gly
 20

<210> 45
 <211> 23

ES 2 689 168 T3

<212> PRT
<213> Virus Influenza A

<400> 45
Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ala Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly
20

5 <210> 46
<211> 24
<212> PRT
<213> Virus Influenza A

<400> 46
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

10 Met Ile Asp Gly Trp Tyr Gly Cys
20

<210> 47
<211> 22
<212> PRT
<213> Virus Influenza A

15 <400> 47
Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Met Ile Asp Gly Gly Cys
20

<210> 48
<211> 35
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 48
Gly Leu Phe Gly Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu
1 5 10 15

His Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly
20 25 30

Gly Ser Cys
35

25 <210> 49
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
30 <223> Descripción de Secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 689 168 T3

<400> 49

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ala Leu Glu Ala Leu Ala Ala Gly Gly
20 25 30

Ser Cys

<210> 50

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Virus Influenza A

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

10 <223> Norleucina

<400> 50

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Xaa Ile Asp Gly Lys
20

<210> 51

<211> 20

15 <212> PRT

<213> Virus Influenza A

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

20 <223> Norleucina

<400> 51

Gly Leu Phe Glu Ala Ile Glu Gly Phe Ile Glu Asn Gly Trp Glu Gly
1 5 10 15

Xaa Ile Asp Gly
20

<210> 52

<211> 16

25 <212> PRT

<213> Drosophila sp.

<400> 52

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 53

30 <211> 13

<212> PRT

<213> Virus de inmunodeficiencia humana

<400> 53

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

35 <210> 54

<211> 27

<212> PRT

<213> Mus sp.

ES 2 689 168 T3

<400> 54
 Gly Ala Leu Phe Leu Gly Trp Leu Gly Ala Ala Gly Ser Thr Met Gly
 1 5 10 15

Ala Trp Ser Gln Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 20 25

5 <210> 55
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 55
 Leu Leu Ile Ile Leu Arg Arg Arg Ile Arg Lys Gln Ala His Ala His
 1 5 10 15

10 Ser Lys
 <210> 56
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 56
 Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Lys Ile Asn Leu Lys
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
 20 25

20 <210> 57
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 57
 Lys Leu Ala Leu Lys Leu Ala Leu Lys Ala Leu Lys Ala Ala Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ala

30 <210> 58
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 58
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5

35 <210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 689 168 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 59

Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
1 5 10

5 <210> 60

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Leu Leu Gly Asp Phe Phe Arg Lys Ser Lys Glu Lys Ile Gly Lys Glu
1 5 10 15

Phe Lys Arg Ile Val Gln Arg Ile Lys Asp Phe Leu Arg Asn Leu Val
20 25 30

Pro Arg Thr Glu Ser
35

10

<210> 61

<211> 31

<212> PRT

<213> Ascaris suum

15

<400> 61

Ser Trp Leu Ser Lys Thr Ala Lys Lys Leu Glu Asn Ser Ala Lys Lys
1 5 10 15

Arg Ile Ser Glu Gly Ile Ala Ile Ala Ile Gln Gly Gly Pro Arg
20 25 30

<210> 62

<211> 30

<212> PRT

20

<213> Homo sapiens

<400> 62

Ala Cys Tyr Cys Arg Ile Pro Ala Cys Ile Ala Gly Glu Arg Arg Tyr
1 5 10 15

Gly Thr Cys Ile Tyr Gln Gly Arg Leu Trp Ala Phe Cys Cys
20 25 30

<210> 63

<211> 36

25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Asp His Tyr Asn Cys Val Ser Ser Gly Gly Gln Cys Leu Tyr Ser Ala
1 5 10 15

Cys Pro Ile Phe Thr Lys Ile Gln Gly Thr Cys Tyr Arg Gly Lys Ala
20 25 30

Lys Cys Cys Lys
35

30

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> Desconocido

ES 2 689 168 T3

<220>
 <223> Descripción de Desconocido: Péptido de bactenicina desconocido

<400> 64
 Arg Lys Cys Arg Ile Val Val Ile Arg Val Cys Arg
 1 5 10

5 <210> 65
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Sus scrofa

<220>
 10 <223> C-term amidated

<400> 65
 Arg Arg Arg Pro Arg Pro Pro Tyr Leu Pro Arg Pro Arg Pro Pro Pro
 1 5 10 15

Phe Phe Pro Pro Arg Leu Pro Pro Arg Ile Pro Pro Gly Phe Pro Pro
 20 25 30

Arg Phe Pro Pro Arg Phe Pro Gly Lys Arg
 35 40

<210> 66
 <211> 13
 15 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>
 <223> Descripción de Desconocido: Péptido de indolicina desconocido

<220>
 20 <223> C-term amidated

<400> 66
 Ile Leu Pro Trp Lys Trp Pro Trp Trp Pro Trp Arg Arg
 1 5 10

<210> 67
 <211> 16
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 67
 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro
 30 1 5 10 15

<210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 68
 Ala Ala Leu Leu Pro Val Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10

40 <210> 69
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlace fosforotioato

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(7)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (16)..(16)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

20 <220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosforotioato

<400> 69
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21

25 <210> 70
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

<220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (1)..(2)
 <223> Enlace fosforotioato

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (3)..(3)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (12)..(12)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

45 <220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosforotioato

<400> 70
 cuuacgcuga guacuucgat t 21

50 <210> 71
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

- <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- 5 <400> 71
ucgaaguacu cagcguaagt t 21
- <210> 72
<211> 21
<212> ADN
10 <213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- 15 <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (1)..(2)
<223> Enlace fosforotioato
- <220>
20 <221> base_modificada
<222> (3)..(3)
<223> 2'-fluoro nucleótido
- <220>
25 <221> base_modificada
<222> (12)..(12)
<223> 2'-fluoro nucleótido
- <220>
30 <221> característica_miscelánea
<222> (20)..(21)
<223> Enlace fosforotioato
- <400> 72
cuuacgcuga guacuucgat t 21
- <210> 73
<211> 21
35 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
- <220>
<223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
40 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- <220>
<221> característica_miscelánea
<222> (1)..(2)
<223> Enlace fosforotioato
- 45 <220>
<221> base_modificada
<222> (7)..(7)
<223> 2'-fluoro nucleótido
- <220>
50 <221> base_modificada
<222> (16)..(16)
<223> 2'-fluoro nucleótido

<220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosforotioato

5 <400> 73
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21

 <210> 74
 <211> 21
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

15 <400> 74
 cuuacgcuga guacuucgat t 21

 <210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

25 <400> 75
 ucgaaguacu cagcguaagt t 21

 <210> 76
 <211> 21
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

35 <400> 76
 ggaucaucuc aagucuuact t 21

 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

45 <400> 77
 guaagacuug agaugaucct t 21

 <210> 78
 <211> 21
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

5 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (4)..(5)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

10 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(10)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(17)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

20 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (19)..(19)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

<220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20)..(21)
 <223> Enlace fosforotioato

25 <400> 78
 ggaucaucuc aagucuuact t 21

<210> 79
 <211> 21
 <212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

35 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (2)..(2)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

40 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (7)..(9)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

45 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (14)..(14)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

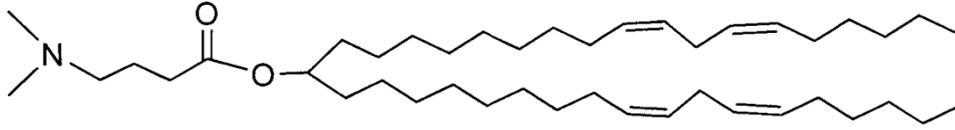
50 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (17)..(19)
 <223> 2'-fluoro nucleótido

<220>
 <221> característica_miscelánea
 <222> (20) .. (21)
 <223> Enlace fosforotioato

<400> 79
guaagacuug agaugaucct t 21

REIVINDICACIONES

1. Un lípido catiónico de Fórmula I:



Fórmula I

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 5
2. El lípido catiónico de la reivindicación 1 para ser usado en la administración de un agente terapéutico a una célula.
3. Una formulación lipídica que comprende un lípido catiónico de la reivindicación 1.
4. La formulación lipídica de la reivindicación 3 que, además, comprende un agente terapéutico, comprendiendo el agente terapéutico un ácido nucleico.
- 10
5. La formulación lipídica de la reivindicación 4 en la que el ácido nucleico se selecciona del grupo constituido por un ARNip, un microARN, un antagomir, un inhibidor de microARN, un ácido nucleico estimulante del sistema inmunitario o un adaptador U1.
6. La formulación lipídica de la reivindicación 3 comprende, además, al menos una apolipoproteína.
7. La formulación lipídica de la reivindicación 4 en la que el agente terapéutico es un antisentido, un ARNip o una ribozima.

15

DLin-M-C3-DMA: Evaluación de diferentes composiciones en modelo de FVII murino

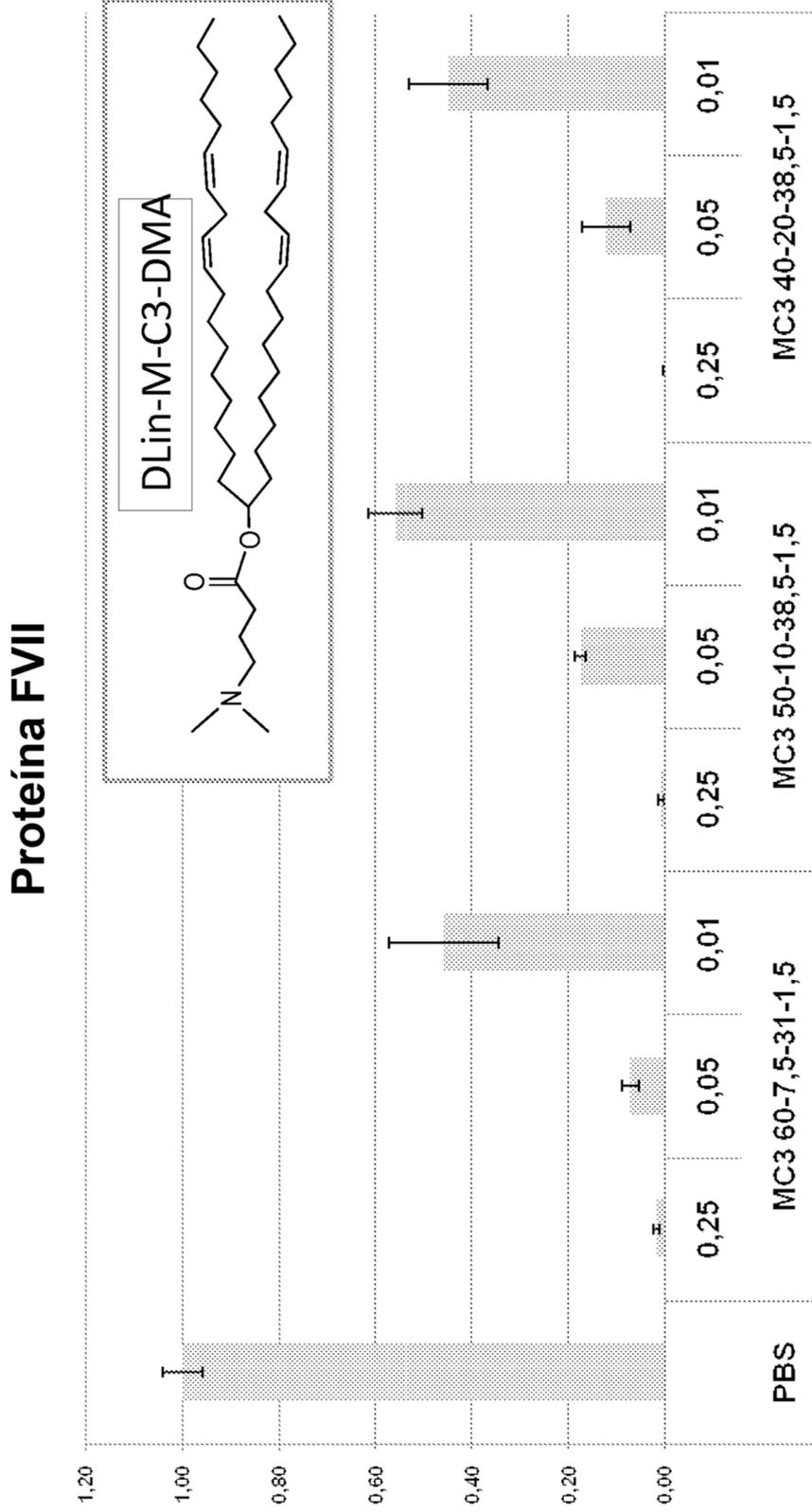


FIG 1

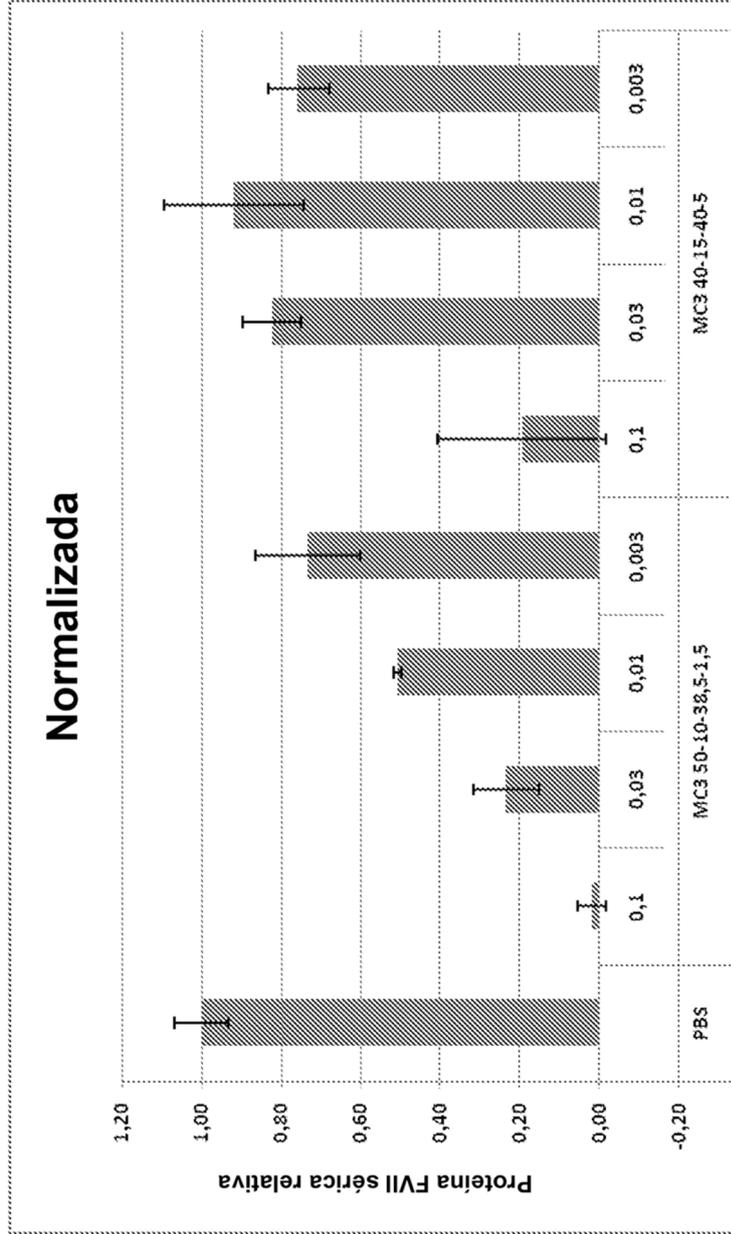


FIG. 2

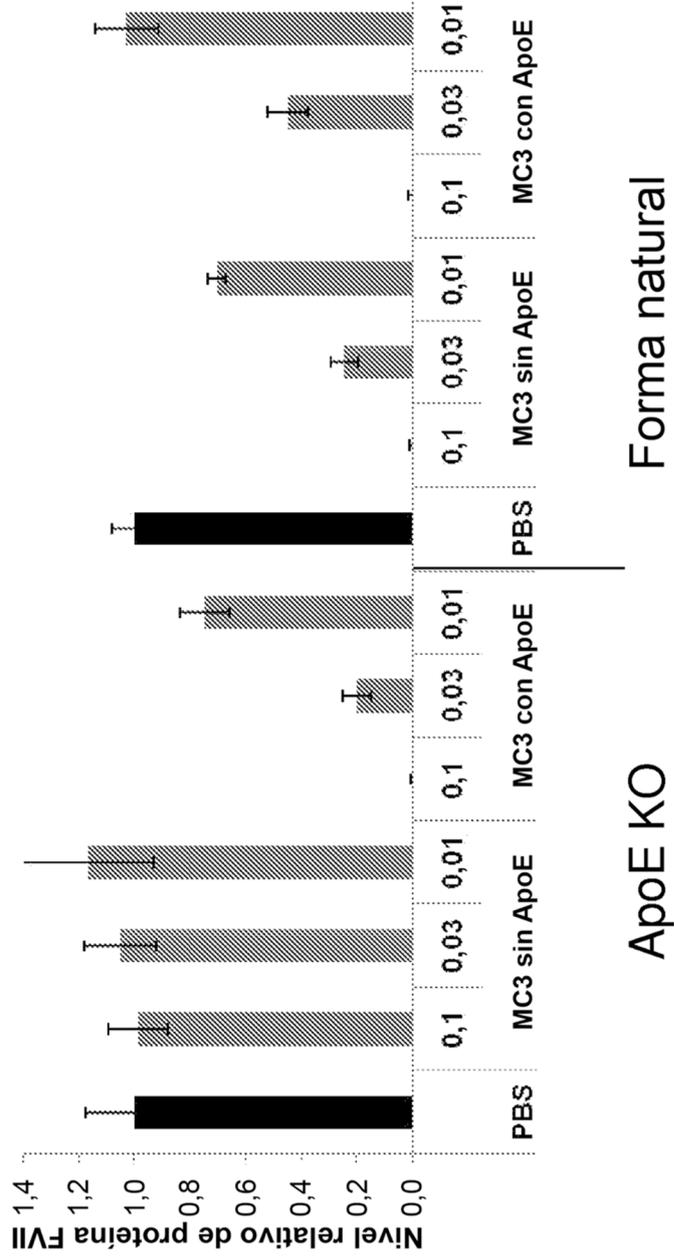


FIG. 3

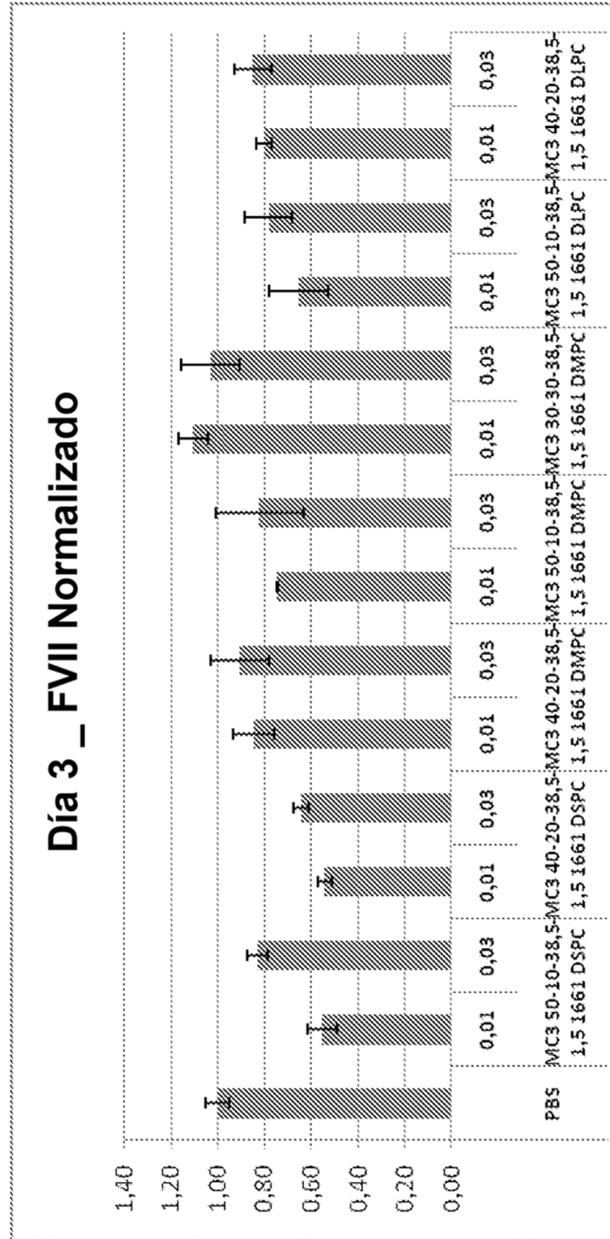


FIG. 4

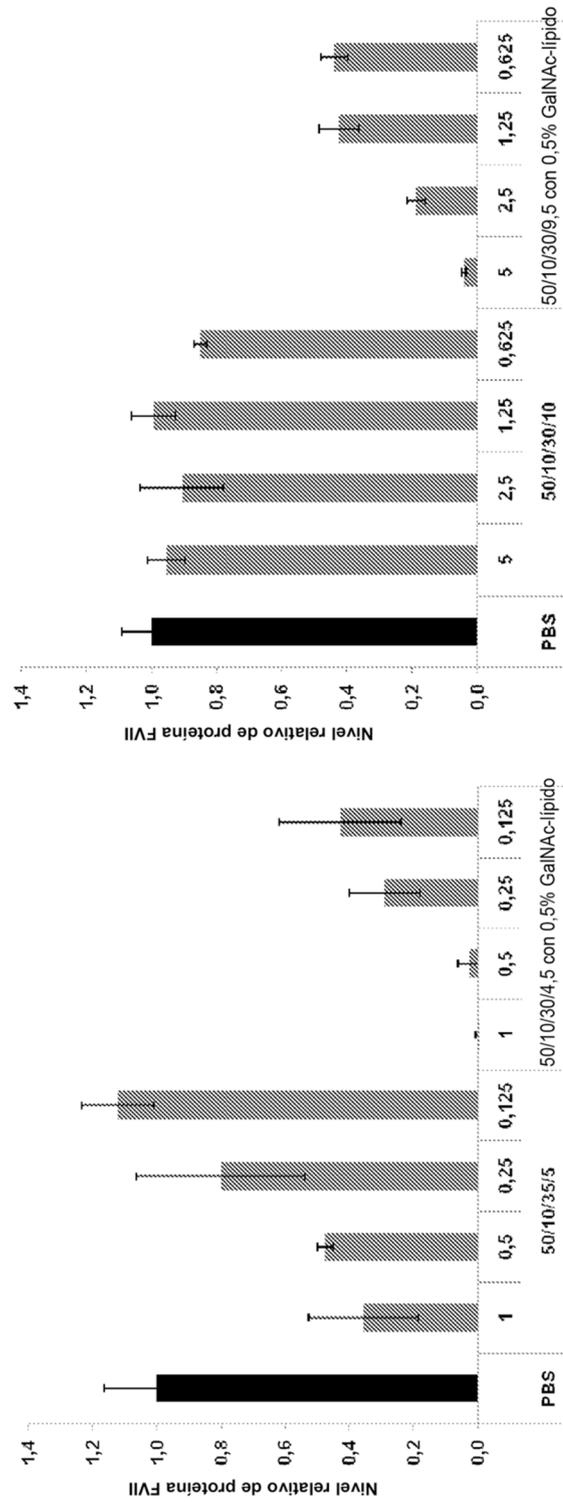


FIG. 5

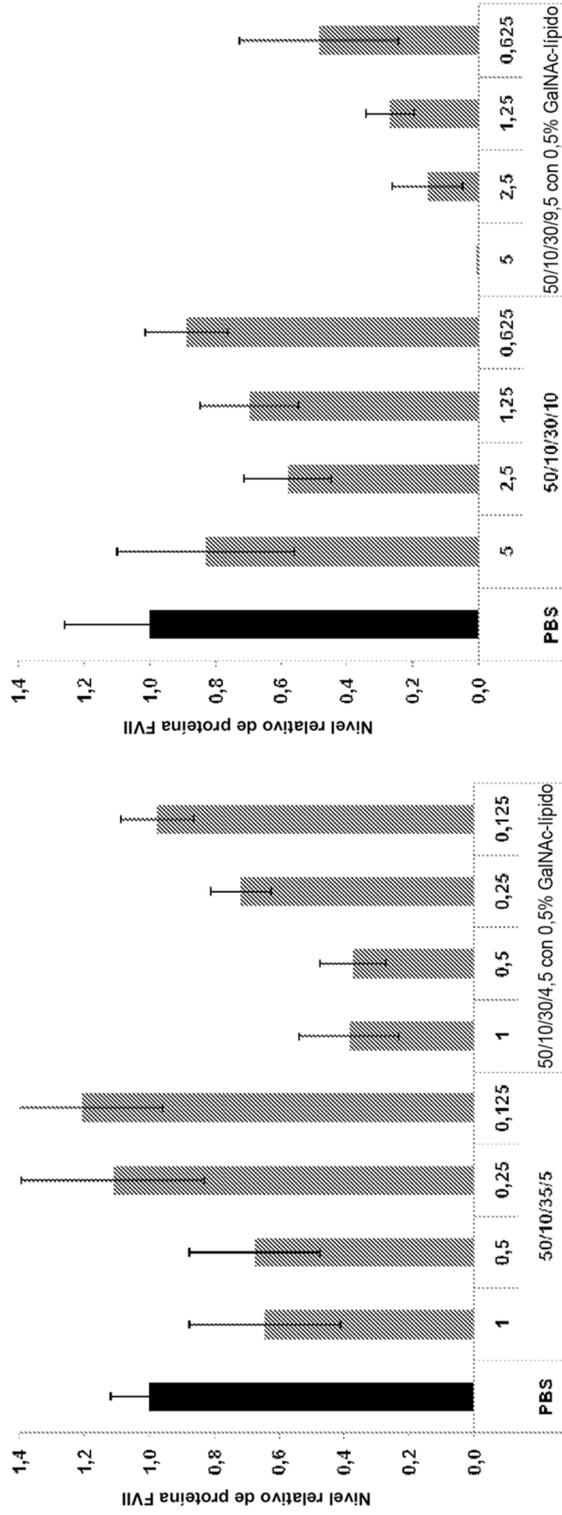


FIG. 6

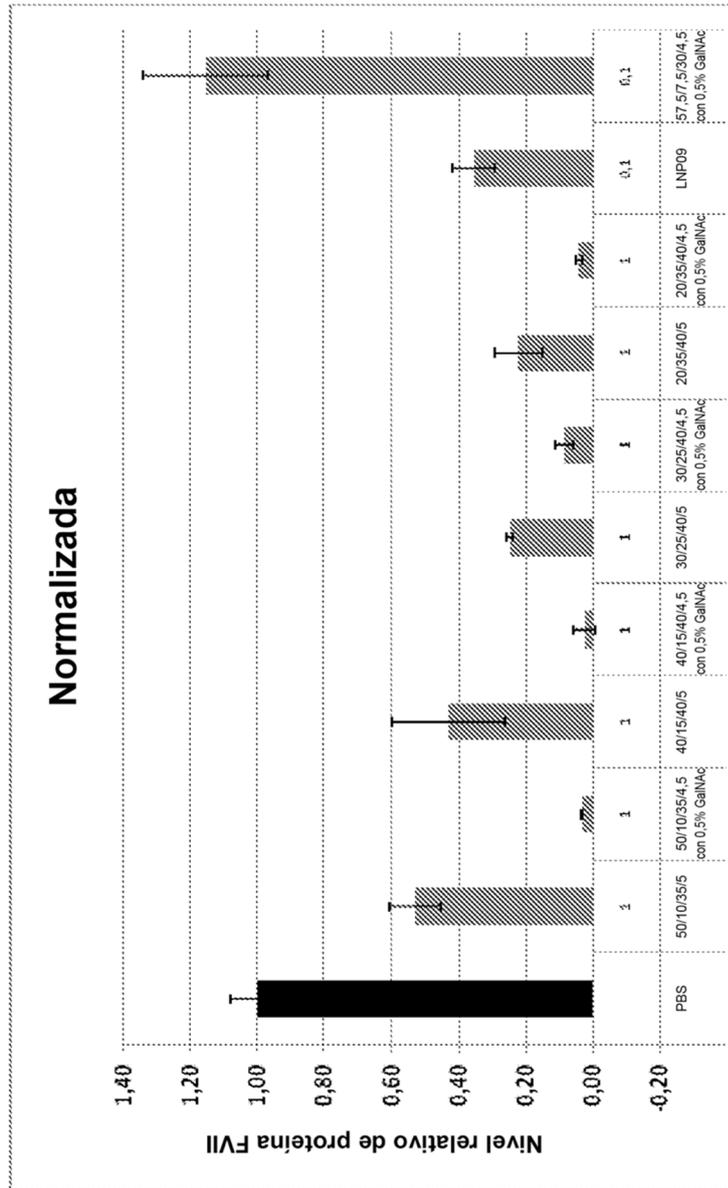


FIG. 7

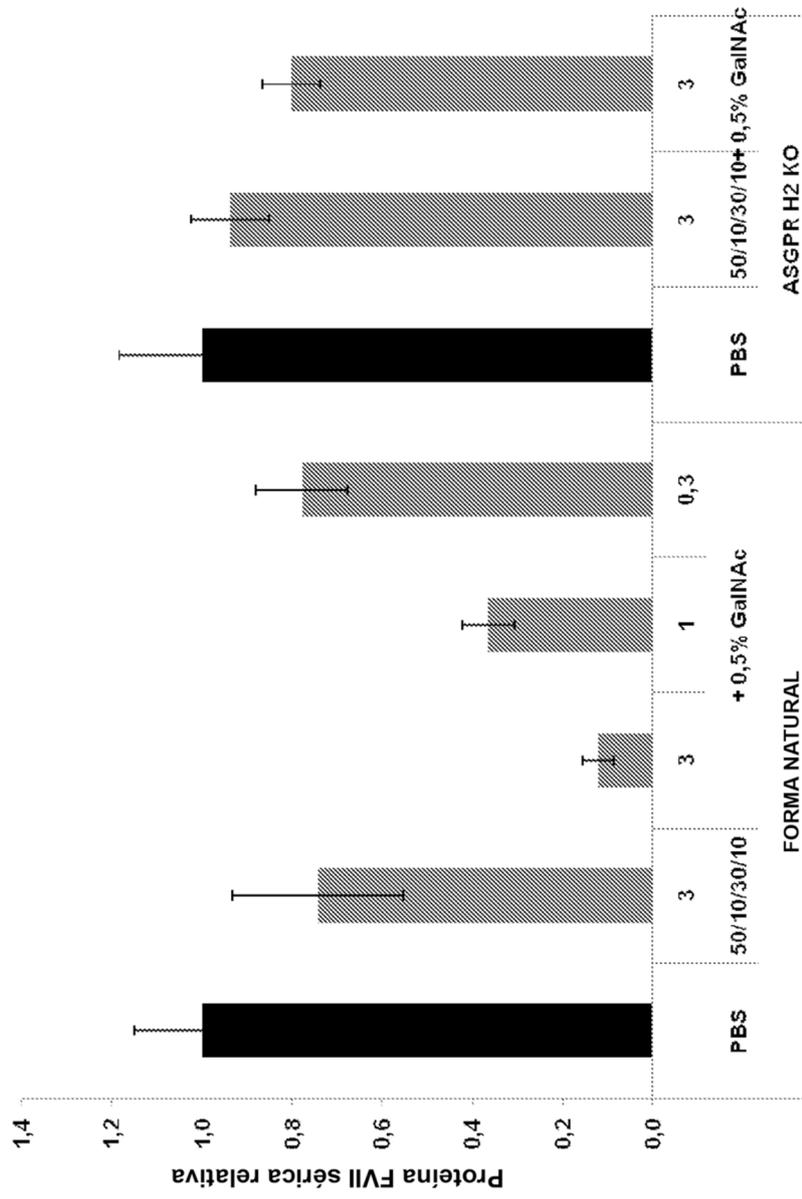


FIG. 8

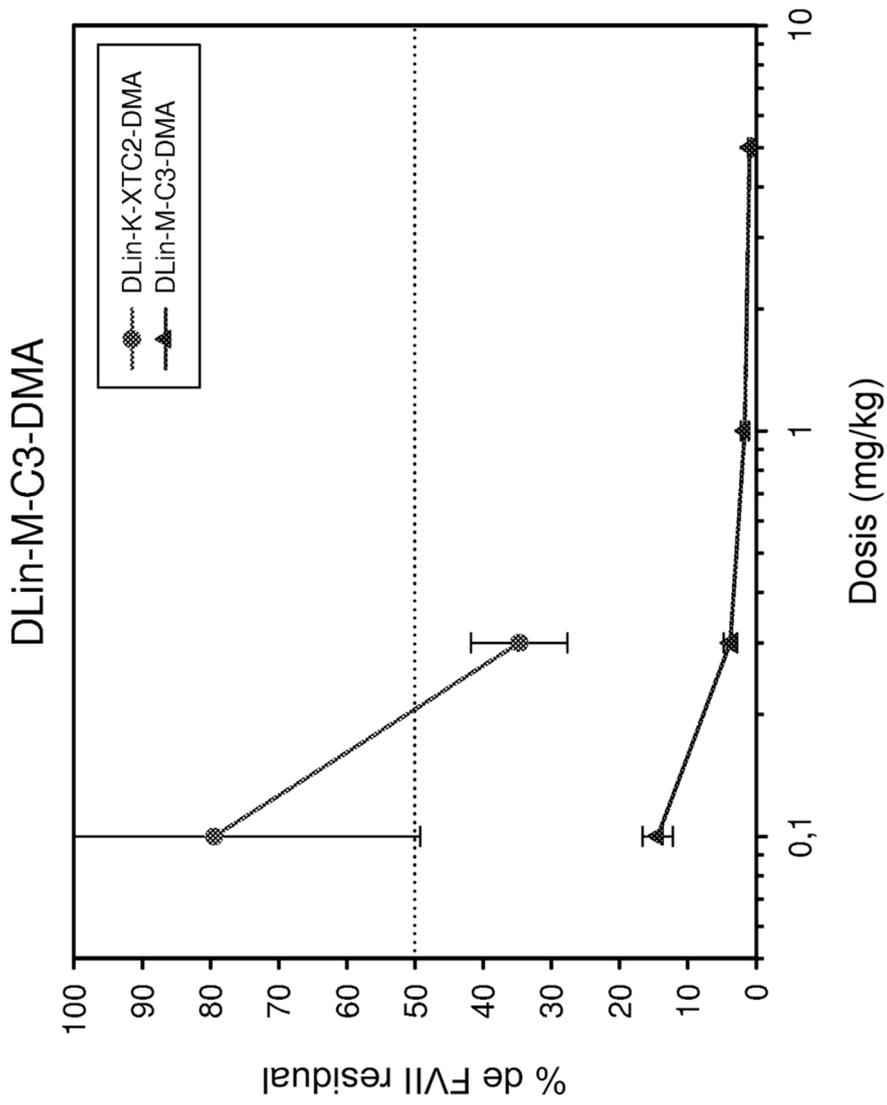


FIG. 9

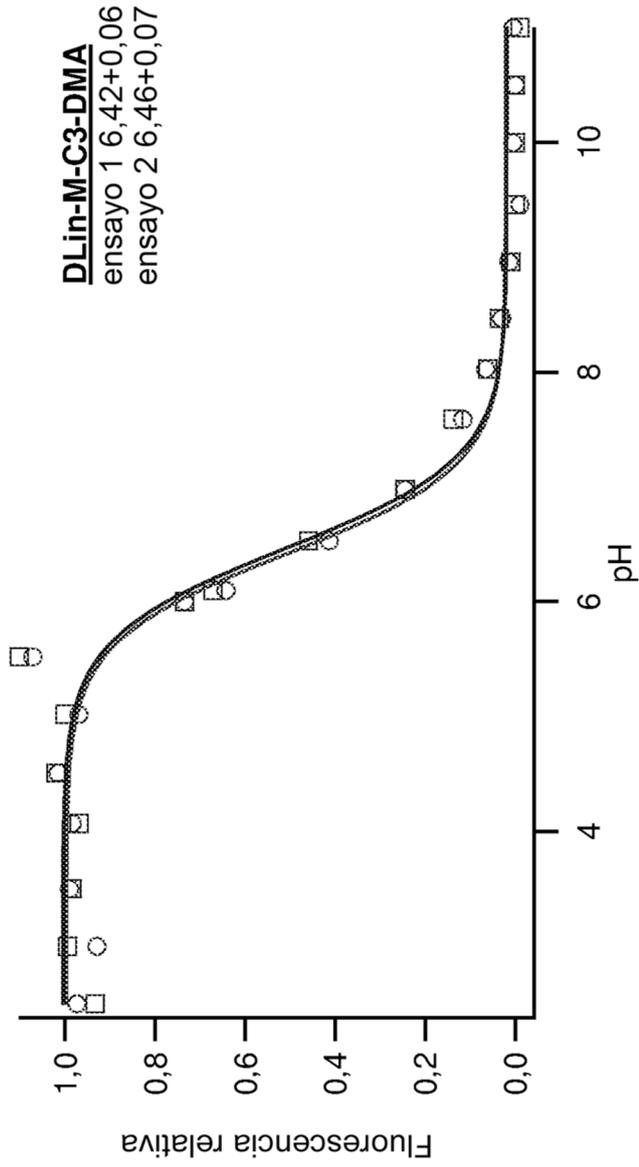


FIG. 10