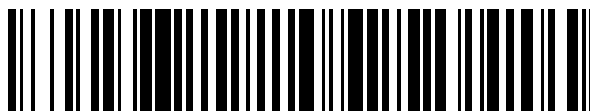


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 874**

51 Int. Cl.:

**C07C 271/20** (2006.01)  
**C07C 217/08** (2006.01)  
**C07C 229/12** (2006.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 9/14** (2006.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 31/7088** (2006.01)  
**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.02.2013 PCT/US2013/027469**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13126803**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.02.2013 E 13709634 (3)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.10.2018 EP 2817287**

54 Título: **Lípidos catiónicos de trialquilo y métodos para su uso**

30 Prioridad:

**24.02.2012 US 201261602990 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.03.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HEYES, JAMES;**  
**WOOD, MARK y**  
**MARTIN, ALAN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 702 874 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

Lípidos catiónicos de trialquilo y métodos para su uso

La presente invención se refiere a nuevos lípidos catiónicos de trialquilo, partículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos de trialquilo, composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos y a sus usos.

5 Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen, p. ej., ARN interferente pequeño (ARNip), microARN (miARN), oligonucleótidos antiparalelos, ribozimas, plásmidos y ácidos nucleicos inmunoestimuladores. Estos ácidos nucleicos actúan por una variedad de mecanismos. En el caso de moléculas de ARN interferentes, tales como ARNip y miARN, estos ácidos nucleicos pueden regular por disminución los niveles intracelulares de proteínas específicas a través de un proceso denominado interferencia por ARN (iARN). Después de introducir ARN interferente en el  
10 citoplasma celular, estas construcciones de ARN bicatenarias se pueden unir a una proteína denominada RISC. La cadena codificante del ARN interferente es desplazada del complejo RISC, proporcionando un molde dentro de RISC que puede reconocer y unirse al ARNm con una secuencia complementaria a la del ARN interferente unido. Habiendo unido el ARNm complementario, el complejo RISC escinde el ARNm y libera las cadenas escindidas. La iARN puede proporcionar regulación por disminución de proteínas específicas al dirigirse a la destrucción específica  
15 del ARNm correspondiente que codifica la síntesis de proteínas.

Las aplicaciones terapéuticas de la iARN son extremadamente amplias, puesto que las construcciones de ARN interferentes se pueden sintetizar con cualquier secuencia de nucleótidos dirigida contra una proteína diana. Hasta la fecha, las construcciones de ARNip han mostrado la capacidad de regular por disminución específicamente  
20 proteínas diana tanto en modelos in vitro como in vivo. Además, las construcciones de ARNip se están evaluando actualmente en estudios clínicos.

Sin embargo, dos problemas a los que se enfrentan actualmente las construcciones de ARN interferente son, primero, su susceptibilidad a la digestión por nucleasas en plasma y, segundo, su capacidad limitada para acceder al compartimento intracelular donde pueden unirse a RISC cuando se administran sistémicamente como moléculas de  
25 ARN interferente libres. Estas construcciones bicatenarias se pueden estabilizar por la incorporación de conectores de nucleótidos químicamente modificados dentro de la molécula, p. ej., grupos fosfotioato. Sin embargo, dichos conectores químicamente modificados proporcionan solo una protección limitada contra la digestión por nucleasas y pueden disminuir la actividad de la construcción. La administración intracelular de ARN interferente se puede facilitar mediante el uso de sistemas vehículos tales como polímeros, liposomas catiónicos, o mediante la unión covalente de un resto de colesterol a la molécula. Sin embargo, se requieren sistemas de suministro mejorados para aumentar  
30 la potencia de las moléculas de ARN interferente, tales como ARNip y miARN, y para reducir o eliminar la necesidad de conectores de nucleótidos químicamente modificados.

Además, siguen existiendo problemas con la capacidad limitada de los ácidos nucleicos terapéuticos, como el ARN interferente para cruzar las membranas celulares (véase, Vlassov et al., *Biochim. Biophys Acta*, 1197: 95-1082 (1994)) y en los problemas asociados con la toxicidad sistémica, como la anafilaxis mediada por el complemento, propiedades coaguladoras alteradas y citopenia (Galbraith et al., *Antisense Nucl. Acid Drug Des.*, 4: 201-206 (1994)).  
35

Para intentar mejorar la eficacia, los investigadores también han usado sistemas de vehículos basados en lípidos para suministrar ácidos nucleicos terapéuticos químicamente modificados o no modificados. Zelphati et al. (*J. Contr. Rel.*, 41: 99-119 (1996)) describen el uso de liposomas aniónicos (convencionales), liposomas sensibles al pH, inmunoliposomas, liposomas fusogénicos y agregados de lípidos/antiparalelos catiónicos. De manera similar, el ARNip se ha administrado sistémicamente en liposomas catiónicos, y se ha descrito que estas partículas de ácido nucleico-lípido proporcionan una mejor regulación por disminución de proteínas diana en mamíferos, incluyendo primates no humanos (Zimmermann et al., *Nature*, 441: 111-114 (2006)).  
40

En este contexto, el documento WO 2001/143230 A1 describe partículas lipídicas que incluyen un lípido catiónico, así como su uso para el suministro de agentes activos. Además, el documento US 2012/0172411 A1 describe composiciones que comprenden lípidos catiónicos y las respectivas nanopartículas lipídicas, así como métodos para el suministro de agentes terapéuticos a células que usan los mismos.  
45

A pesar de este avance, sigue existiendo la necesidad en la técnica de composiciones mejoradas de lípido-ácido nucleico terapéutico que sean adecuadas para uso terapéutico general. Preferiblemente, estas composiciones encapsularían ácidos nucleicos con alta eficacia, tendrían altas relaciones fármaco:lípido, protegerían el ácido nucleico encapsulado de la degradación y eliminación en suero, serían adecuadas para el suministro sistémico y proporcionarían suministro intracelular del ácido nucleico encapsulado. Además, estas partículas de ácido nucleico-lípido deben ser bien toleradas y proporcionar un índice terapéutico adecuado, de modo que el tratamiento del paciente con una dosis eficaz del ácido nucleico no esté asociado con una toxicidad significativa y/o riesgo para el  
50 paciente.  
55

La presente invención se refiere a los siguientes ítems:

1. Un lípido que tiene una fórmula estructural (I):



(I)

o sus sales, en donde:

5 X es alquilamino;

A es alquilo o cicloalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido,

en donde dicho alquilo o cicloalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido puede ser saturado o insaturado,

en donde A puede estar presente o no, y

10 en donde la expresión "alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido" se refiere a la sustitución de al menos un átomo de hidrógeno por un sustituyente, seleccionado del grupo que consiste en oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR<sup>x</sup>, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>, y -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>,

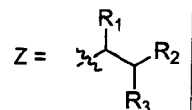
en donde

n es 0, 1 o 2,

15 R<sup>x</sup> y R<sup>y</sup> son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de los sustituyentes alquilo y heterociclo puede estar además sustituido con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR<sup>x</sup>, heterociclo, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>, y -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>;

20 Y se selecciona del grupo que consiste en cetil, éster, carbamato opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> saturado o insaturado, éter, y amida opcionalmente sustituida con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> saturado o insaturado; y

Z tiene la fórmula:

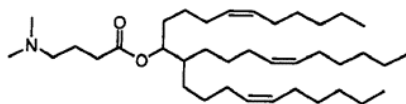


25 en donde, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>8</sub> a C<sub>11</sub>, en donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> puede ser independientemente saturado o insaturado, y en donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo.

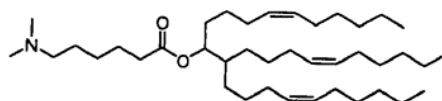
2. El lípido del ítem 1, en donde al menos uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> tiene un doble enlace, preferiblemente un doble enlace cis.

3. El lípido del ítem 1, en donde X se selecciona del grupo que consiste en dimetilamino, dietilamino y etilmetilamino.

4. El lípido del ítem 1, seleccionado del grupo que consiste en:

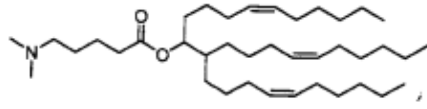


Compuesto 9,

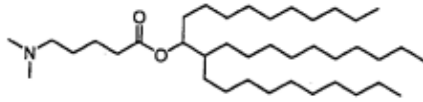


Compuesto 11,

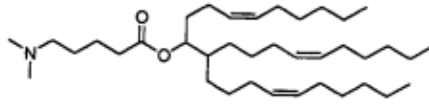
30



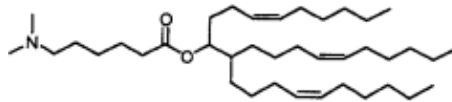
Compuesto 13,



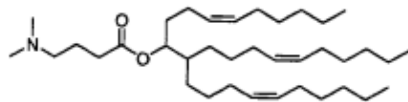
Compuesto 14,



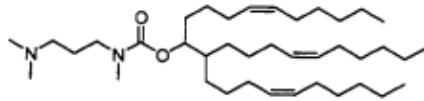
Compuesto 19,



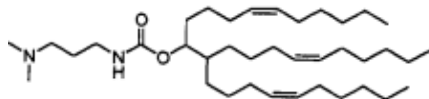
Compuesto 21,



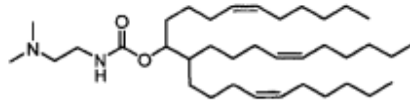
Compuesto 22,



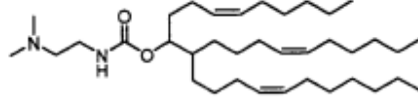
Compuesto 23,



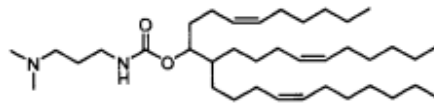
Compuesto 24,



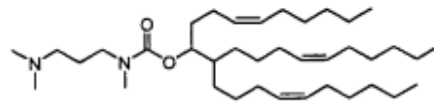
Compuesto 25,



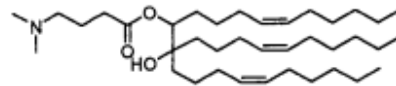
Compuesto 26,



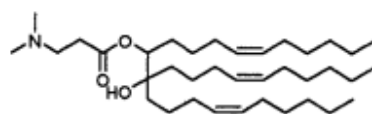
Compuesto 27,



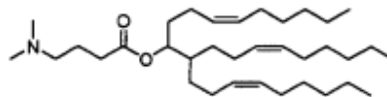
Compuesto 28,



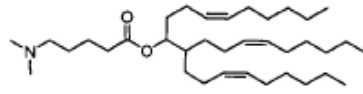
Compuesto 30,



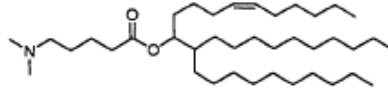
Compuesto 31,



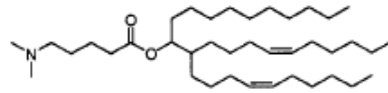
Compuesto 40,



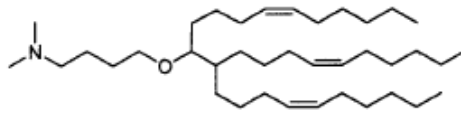
Compuesto 42,



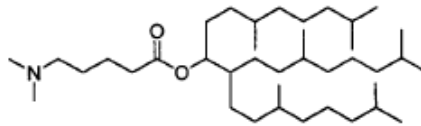
Compuesto 50,



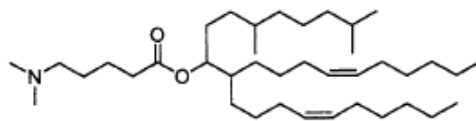
Compuesto 53,



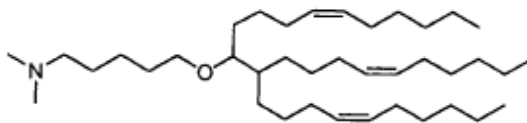
Compuesto 62,



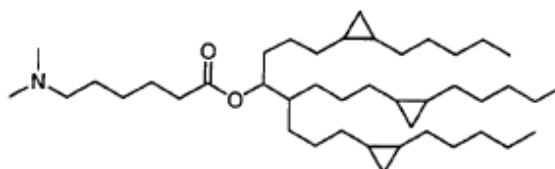
Compuesto 71,



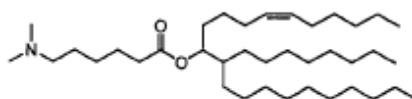
Compuesto 74,



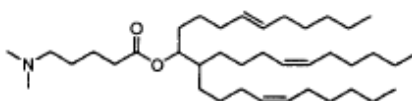
Compuesto 76,



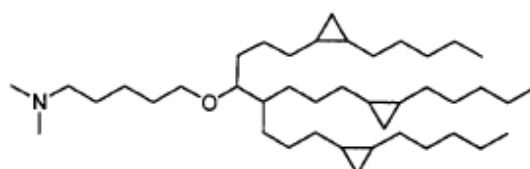
Compuesto 79,



Compuesto 83,



Compuesto 89, y



Compuesto 90.

5. Una partícula lipídica que comprende un lípido de cualquiera de los ítems anteriores.
6. La partícula lipídica del ítem 5, en donde la partícula comprende además un lípido no catiónico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un fosfolípido, colesterol o derivado de colesterol, o una mezcla de un fosfolípido y colesterol o derivado de colesterol, en donde el fosfolípido comprende preferiblemente dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidil-colina (DSPC), o una de sus mezclas.
7. La partícula lipídica del ítem 5 o ítem 6, en donde la partícula comprende además un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas, que comprende preferiblemente un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, en donde el conjugado de PEG-lípido comprende preferiblemente un conjugado de PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado de PEG-dialquiloxipropilo (PEG-DAA), o una de sus mezclas.
8. La partícula lipídica de cualquiera de los ítems 5 a 7, en donde la partícula comprende además un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es preferiblemente un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARNm o un ARN interferente, en donde el ARN interferente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN interferente asimétrico (ARNia), un microARN (miARN), un ARNbc sustrato de Dicer, un ARN de horquilla corta (ARNhc), y sus mezclas.
9. La partícula lipídica del ítem 8, en donde el agente terapéutico está completamente encapsulado en la partícula.

10. La partícula lipídica del ítem 8, en donde la partícula tiene una relación en masa lípido:agente terapéutico de aproximadamente 5:1 a aproximadamente 15:1.
11. La partícula lipídica de cualquiera de los ítems 5 a 10, en donde la partícula tiene un diámetro mediano de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm.
- 5 12. Una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica de cualquiera de los ítems 5 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Una partícula lipídica del ítem 5 para usar en un método para el suministro in vivo de un agente terapéutico a un mamífero, en donde el mamífero es preferiblemente un ser humano.
- 10 14. La partícula lipídica para usar el ítem 13, en donde la administración se selecciona del grupo que consiste en oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intraquaqueal, subcutánea e intradérmica.
15. Una partícula lipídica del ítem 5 para usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, seleccionado del grupo que consiste en una infección vírica, una enfermedad o trastorno hepático y cáncer en un mamífero que lo necesite, en donde el mamífero es preferiblemente un ser humano.
- 15 La presente invención proporciona nuevos lípidos catiónicos (amino) de trialquilo y partículas lipídicas que comprenden estos lípidos, que son ventajosos para el suministro in vivo de ácidos nucleicos, así como composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido adecuadas para el uso terapéutico in vivo. Además, se describen en la presente memoria métodos para hacer estas composiciones, así como métodos para introducir ácidos nucleicos en células usando estas composiciones. p. ej., para el tratamiento de diversas enfermedades.
- 20 También se describen en la presente memoria compuestos nuevos y compuestos intermedios.
- Como se describe en el ejemplo 2 en la presente memoria, los lípidos catiónicos de trialquilo de la presente invención son más potentes, en un ensayo de ARNip de ApoB murino, que los lípidos por lo demás idénticos que tienen cadenas de alquilo más largas.
- 25 Con respecto a los lípidos de fórmula (I), los ejemplos representativos de grupos alquilamino incluyen dimetilamino, dietilamino y etilmetilamino.
- De nuevo con respecto a los lípidos de fórmula (I), se entenderá que cuando una cadena de alquilo del resto hidrófobo Z contiene uno o más dobles enlaces o enlaces triples, entonces esa cadena de alquilo se denomina insaturada.
- 30 De nuevo con respecto a los lípidos de fórmula (I), se entenderá, para evitar dudas, que una o más cadenas de alquilo del resto hidrófobo Z pueden incluir un grupo cicloalquilo (p. ej., un ciclopropilo).
- De nuevo con respecto a los lípidos de fórmula (I), se entenderá que el término "éster" incluye ésteres que tienen la estructura -C(=O)O- o -OC(=O)-. El término "amida" incluye amidas que tienen la estructura -C(=O)NR- o -NR(=O)C-. El término "carbamato" incluye carbamatos que tienen la estructura -OC(=O)NR- o -NRC(=O)O-.
- 35 Los lípidos de fórmula (I) son útiles, por ejemplo, para hacer las partículas lipídicas de la invención que son útiles, por ejemplo, para suministrar agentes terapéuticos (p. ej., moléculas de ácido nucleico biológicamente activas, como ARNip) a un mamífero (p. ej., ser humano) que lo necesite.
- En ciertas realizaciones, el agente activo o agente terapéutico está completamente encapsulado dentro de la parte lipídica de la partícula lipídica, de modo que el agente activo o agente terapéutico en la partícula lipídica es resistente en solución acuosa a la degradación enzimática, p. ej., por una nucleasa o proteasa. En realizaciones
- 40 adicionales, la partícula lipídica es sustancialmente no tóxica para mamíferos tales como seres humanos.
- En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona partículas lipídicas (p. ej., LNP) que comprenden: (a) uno o más ácidos nucleicos tales como moléculas de ARN interferente; (b) uno o más lípidos catiónicos de fórmula I o sus sales, p. ej., sales farmacéuticamente aceptables; (c) uno o más lípidos no catiónicos; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas.
- 45 En algunas realizaciones, la presente invención proporciona partículas lipídicas (p. ej., LNP) que comprenden: (a) uno o más ácidos nucleicos; (b) uno o más lípidos catiónicos de fórmula I o sus sales, p. ej., sales farmacéuticamente aceptables, que comprenden de aproximadamente 50% en moles hasta aproximadamente 85% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente 13% en moles a aproximadamente 49,5% en moles de los lípidos totales presentes en la
- 50 partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden de aproximadamente 0,5% en moles a aproximadamente 2% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula.
- En un aspecto de esta realización, la partícula lipídica (p. ej., LNP) comprende: (a) un ácido nucleico; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, p. ej., una sal farmacéuticamente aceptable, que comprende de



aproximadamente 52% en moles a aproximadamente 62% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o uno de sus derivados que comprende de aproximadamente 36% en moles a aproximadamente 47% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 2% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido en general se denomina en la presente memoria la formulación "1:57". En una realización particular, la formulación 1:57 es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 1,4% en moles de conjugado de PEG-lípido (p. ej., PEG2000-C-DMA), aproximadamente 57,1% en moles de lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, aproximadamente 7,1% en moles de DPPC (o DSPC), y aproximadamente 34,3% en moles de colesterol (o su derivado).

En otro aspecto de esta realización, la partícula lipídica (p. ej., LNP) comprende: (a) un ácido nucleico; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, p. ej., una sal farmacéuticamente aceptable, que comprende de aproximadamente 56,5% en moles hasta aproximadamente 66,5% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) colesterol o uno de sus derivados que comprende de aproximadamente 31,5% en moles a aproximadamente 42,5% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 2% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido en general se denomina en la presente memoria la formulación "1:62". En una realización particular, la formulación 1:62 es un sistema de tres componentes que está exento de fosfolípidos y comprende aproximadamente 1,5% en moles de conjugado de lípido-PEG (p. ej., PEG2000-C-DMA), aproximadamente 61,5% en moles de lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, y aproximadamente el 36,9% en moles de colesterol (o su derivado).

Realizaciones adicionales relacionadas con las formulaciones 1:57 y 1:62 se describen en la publicación PCT n° WO 09/127060.

En otras realizaciones, la presente invención proporciona partículas lipídicas (p. ej., LNP) que comprenden: (a) uno o más ácidos nucleicos; (b) uno o más lípidos catiónicos de fórmula I o II o sus sales, p. ej., sales farmacéuticamente aceptables, que comprenden de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 50% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 90% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas que comprenden de aproximadamente 0,5% en moles a aproximadamente 20% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula.

En un aspecto de esta realización, la partícula lipídica (p. ej., LNP) comprende: (a) un ácido nucleico; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, p. ej., una sal farmacéuticamente aceptable, que comprende de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 50% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o uno de sus derivados, que comprende de aproximadamente 47% en moles a aproximadamente 69% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) un conjugado PEG-lípido que comprende de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 3% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula. Esta realización de partícula lipídica se denomina en general en la presente memoria la formulación "2:40". En una realización particular, la formulación 2:40 es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 2% en moles de conjugado de PEG-lípido (p. ej., PEG2000-C-DMA), aproximadamente 40% en moles de lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, aproximadamente 10% en moles de DPPC (o DSPC), y aproximadamente 48% en moles de colesterol (o su derivado).

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP) que comprenden: (a) uno o más ácidos nucleicos; (b) uno o más lípidos catiónicos de fórmula I o sus sales, p. ej., sales farmacéuticamente aceptables, que comprenden de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 65% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) uno o más lípidos no catiónicos que comprenden de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 45% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) uno o más lípidos conjugados que inhiben la agregación de partículas, que comprenden de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 10% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula.

En un aspecto de esta realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) un ácido nucleico; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, p. ej., una sal farmacéuticamente aceptable, que comprende de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 60% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) una mezcla de un fosfolípido y colesterol o uno de sus derivados que comprende de aproximadamente 35% en moles a aproximadamente 45% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 10% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido en general se denomina en la presente memoria la formulación "7:54". En ciertos casos, la mezcla lipídica no catiónica en la formulación 7:54 comprende: (i) un fosfolípido de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 10% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (ii) colesterol o uno de sus derivados de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 35% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula. En una realización particular, la formulación 7:54 es un sistema de cuatro componentes que comprende aproximadamente 7% en moles de conjugado de PEG-lípido (p. ej., PEG750-C-DMA), aproximadamente 54% en moles de lípido catiónico de fórmula I

o una de sus sales, aproximadamente 7% en moles de DPPC (o DSPC), y aproximadamente 32% en moles de colesterol (o su derivado).

En otro aspecto de esta realización, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) un ácido nucleico; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, p. ej., una sal farmacéuticamente aceptable, que comprende de aproximadamente 55% en moles a aproximadamente 65% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; (c) colesterol o uno de sus derivados que comprende de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 40% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula; y (d) un conjugado de PEG-lípido que comprende de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 10% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula. Esta realización de partícula de ácido nucleico-lípido en general se denomina en la presente memoria la formulación "7:58". En una realización particular, la formulación 7:58 es un sistema de tres componentes que está exento de fosfolípidos y comprende aproximadamente 7% en moles de conjugado de lípido-PEG (p. ej., PEG750-C-DMA), aproximadamente 58% en moles de lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales, y aproximadamente 35% en moles de colesterol (o su derivado).

Realizaciones adicionales relacionadas con las formulaciones 7:54 y 7:58 se describen en la solicitud de patente publicada de EE. UU. nº US2011/0076335, presentada el 30 de junio de 2010.

Se describen en la presente memoria métodos para introducir uno o más agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos en una célula, comprendiendo el método poner en contacto la célula con una partícula lipídica descrita en la presente memoria (p. ej., LNP). En una realización, la célula está en un mamífero y el mamífero es un humano.

Además, se describen en la presente memoria métodos para el suministro in vivo de uno o más agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos, comprendiendo el método administrar a un mamífero una partícula lipídica descrita en la presente memoria (p. ej., LNP). En ciertas realizaciones, las partículas lipídicas (p. ej., LNP) se administran por una de las siguientes vías de administración: oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea e intradérmica. En realizaciones particulares, las partículas lipídicas (p. ej., LNP) se administran de forma sistémica, p. ej., por vías de administración enteral o parenteral. En realizaciones preferidas, el mamífero es un ser humano.

Además, se describen en la presente memoria métodos para tratar una enfermedad o trastorno en un mamífero que lo necesite, comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula lipídica (p. ej., LNP) que comprende uno o más agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos. Los ejemplos no limitantes de enfermedades o trastornos incluyen una infección viral, una enfermedad o trastorno hepático y cáncer. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

Se describen en la presente memoria métodos para tratar una enfermedad o trastorno hepático mediante la administración de un ácido nucleico tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip) en partículas de ácido nucleico-lípidos (p. ej., LNP), solo o en combinación con un agente reductor de lípidos. Los ejemplos de enfermedades y trastornos lipídicos incluyen, pero no se limitan a dislipidemia (p. ej., hiperlipidemias tales como niveles elevados de triglicéridos (hipertrigliceridemia) y/o niveles elevados de colesterol (hipercolesterolemia), aterosclerosis, enfermedad coronaria, enfermedad arterial coronaria, enfermedad cardiovascular aterosclerótica (CVD), enfermedad del hígado graso (esteatosis hepática), metabolismo lipídico anormal, metabolismo del colesterol anormal, diabetes (incluyendo la diabetes tipo 2), obesidad, enfermedades cardiovasculares y otros trastornos relacionados con el metabolismo anormal. Los ejemplos no limitantes de agentes reductores de lípidos incluyen estatinas, fibratos, ezetimibe, tiazolidindionas, niacina, bloqueadores beta, nitroglicerina, antagonistas del calcio y aceite de pescado.

Además, se describe en la presente memoria un método para disminuir o reducir los niveles de colesterol en un mamífero (p. ej., ser humano) que lo necesite (p. ej., un mamífero con niveles elevados de colesterol en la sangre), comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (p. ej., una formulación de LNP) descrita en la presente memoria, que comprende uno o más ARN interferentes (p. ej., ARNip) que se dirigen a uno o más genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos. Además, se describe en la presente memoria un método para disminuir o reducir los niveles de triglicéridos en un mamífero (p. ej., ser humano) que lo necesite (p. ej., un mamífero con niveles elevados de triglicéridos en la sangre), comprendiendo el método administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente eficaz de una partícula de ácido nucleico-lípido (p. ej., una formulación de LNP) descrita en la presente memoria que comprende uno o más ARN interferentes (p. ej., ARNip) que se dirigen a uno o más genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos. Estos métodos se pueden llevar a cabo in vitro usando técnicas convencionales de cultivo de tejidos o in vivo administrando el ARN interferente (p. ej., ARNip) usando cualquier medio conocido en la técnica. En realizaciones preferidas, el ARN interferente (p. ej., ARNip) se suministra en una célula del hígado (p. ej., hepatocito) en un mamífero como un ser humano.

Se describen realizaciones adicionales relacionadas con el tratamiento de una enfermedad o trastorno hepático que usa una partícula lipídica, p. ej., en la solicitud PCT nº PCT/CA2010/000120, presentada el 26 de enero de 2010, y publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0134189.

5 Se describen en este documento métodos para tratar un trastorno de proliferación celular tal como el cáncer, por administración de un ácido nucleico, tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip) en partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP), solo o en combinación con un medicamento de quimioterapia. Los métodos se pueden llevar a cabo in vitro usando técnicas convencionales de cultivo de tejidos o in vivo administrando el ARN interferente (p. ej., ARNip) usando cualquier medio conocido en la técnica. En realizaciones preferidas, el ARN interferente (p. ej., ARNip) se administra a una célula de cáncer en un mamífero tal como un ser humano, solo o en combinación con un fármaco de quimioterapia. Las partículas de ácido nucleico-lípido y/o fármacos de quimioterapia también se pueden administrar conjuntamente con agentes hormonales, productos inmunoterapéuticos y/o radioterapéuticos convencionales.

10 Se describen realizaciones adicionales relacionadas con el tratamiento de un trastorno de proliferación celular usando una partícula lipídica, p. ej., en la publicación PCT n° WO 09/082817, publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2009/0149403 y publicación PCT n° WO 09/129319.

15 Se describen en la presente memoria métodos para prevenir o tratar una infección vírica tal como un arnavirus (p. ej., virus Lassa) o filovirus (p. ej., virus del ébola, virus de Marburg, etc.) infección que causa fiebre hemorrágica o una Infección por hepatitis (p. ej., virus de la hepatitis C) que causa hepatitis aguda o crónica, por administración de un ácido nucleico tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip) en partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP), solo o en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar o mejorar la afección vírica o cualquiera de los síntomas asociados con la misma. Los métodos se pueden llevar a cabo in vitro usando técnicas convencionales de cultivo de tejidos o in vivo administrando el ARN interferente usando cualquier medio conocido en la técnica. En ciertas realizaciones, el ARN interferente (p. ej., ARNip) se suministra a células, tejidos u órganos de un mamífero, tal como un ser humano que está infectado y/o es susceptible de estar infectado con el virus de la fiebre hemorrágica, tal como p. ej., células del sistema reticuloendotelial (p. ej., monocitos, macrófagos, etc.). En algunas otras realizaciones, el ARN interferente (p. ej., ARNip) se suministra a células, tejidos u órganos de un mamífero, tal como un ser humano que está infectado y/o es susceptible de estar infectado con el virus de la hepatitis, tal como p. ej., células del hígado (p. ej., hepatocitos).

20 Se describen realizaciones adicionales relacionadas con la prevención o tratamiento de una infección vírica usando una partícula lipídica, p. ej., en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2007/0218122, publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2007/0135370 y solicitud PCT n° PCT/CA2010/000444, titulado "Composiciones y métodos para silenciar la expresión del virus de la hepatitis C", presentado el 19 de marzo de 2010.

30 Las partículas lipídicas de la invención (p. ej., LNP), que comprenden uno o más lípidos catiónicos de fórmula I o sus sales, p. ej., sales farmacéuticamente aceptables, son particularmente ventajosas y adecuadas para usar en la administración de ácidos nucleicos tales como ARN interferente a un sujeto (p. ej., un mamífero como un ser humano) porque son estables en circulación, de un tamaño requerido para el comportamiento farmacodinámico que da el acceso a sitios extravasculares, y son capaces de alcanzar poblaciones de células diana.

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

## I. Introducción

40 La presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de nuevos lípidos catiónicos (amino) que proporcionan ventajas cuando se usan en partículas lipídicas para el suministro in vivo de un agente activo o terapéutico tal como un ácido nucleico, en una célula de un mamífero. En particular, se describen en la presente memoria composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido que comprenden uno o más de los nuevos lípidos catiónicos descritos en la presente memoria que proporcionan mayor actividad del ácido nucleico (p. ej., ARN interferente) y tolerancia mejorada de las composiciones in vivo, dando como resultado un aumento significativo en el índice terapéutico en comparación con las composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido descritas previamente.

45 En realizaciones particulares, se describen en la presente memoria nuevos lípidos catiónicos que permiten la formulación de composiciones mejoradas para el suministro in vitro e in vivo de ARN interferente tal como ARNip. Se muestra en la presente memoria que estas composiciones mejoradas de partículas lipídicas son eficaces para regular por disminución (p. ej., silenciamiento) los niveles de proteína y/o los niveles de ARNm de los genes diana. Además, se muestra en la presente memoria que la actividad de estas composiciones mejoradas de partículas lipídicas depende de la presencia de los nuevos lípidos catiónicos descritos en la presente memoria.

50 Las partículas lipídicas y las composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para una variedad de propósitos, incluyendo el suministro de agentes terapéuticos encapsulados o asociados (p. ej., complejados) tales como ácidos nucleicos a células, tanto in vitro como in vivo. Por consiguiente, se describen en la presente memoria métodos para tratar enfermedades o trastornos en un sujeto que lo necesite, poniendo en contacto al sujeto con una partícula lipídica que encapsula o está asociada con un agente terapéutico adecuado, en donde la partícula lipídica comprende uno o más de los nuevos lípidos catiónicos descritos en la presente memoria.

Como se describe en la presente memoria, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria son particularmente útiles para el suministro de ácidos nucleicos, que incluyen, p. ej., moléculas de ARN interferente tales como ARNip. Por lo tanto, las partículas lipídicas y composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para disminuir la expresión de genes y proteínas diana, tanto in vitro como in vivo, poniendo en contacto células con una partícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos nuevos descritos en la presente memoria, en donde la partícula lipídica encapsula o está asociada con un ácido nucleico que reduce la expresión del gen diana (p. ej., un ARNip). Alternativamente, las partículas lipídicas y composiciones descritas en la presente memoria se pueden usar para aumentar la expresión de una proteína deseada tanto in vitro como in vivo, poniendo en contacto las células con una partícula lipídica que comprende uno o más lípidos catiónicos nuevos descritos en la presente memoria, en donde la partícula lipídica encapsula o está asociada con un ácido nucleico que mejora la expresión de la proteína deseada (p. ej., un plásmido que codifica la proteína deseada).

A continuación se describen con más detalle varias realizaciones de ejemplo de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria, partículas lipídicas y composiciones que comprenden los mismos, y su uso para suministrar agentes activos o terapéuticos tales como ácidos nucleicos para modular la expresión de genes y proteínas.

## II. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, los siguientes términos tienen los significados que se les asigna salvo que se especifique lo contrario.

El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con la cantidad de un componente en una partícula lipídica o formulación descrita en la presente memoria, abarca valores que son más o menos 5% de la cantidad indicada del componente (p. ej., aproximadamente 10% abarca valores de 9,5% a 10,5%). Por lo tanto, el término "aproximadamente" también incluye valores que son más o menos 1%, 2%, 3% o 4% de la cantidad establecida del componente.

El término "ARN interferente" o "iARN" o "secuencia de ARN interferente" como se usa en la presente memoria incluye ARN monocatenario (p. ej., miRNA maduro, oligonucleótidos iARNmc, oligonucleótidos iADNmc) o ARN bicatenario (es decir, ARN dúplex tal como ARNip, ARNbc substrato de Dicer, ARNhc, ARNia o pre-miARN) que es capaz de reducir o inhibir la expresión de un gen o secuencia diana (p. ej., mediando la degradación o inhibiendo la traducción de los ARNm que son complementarios a la secuencia de ARN interferente) cuando el ARN interferente está en la misma célula que el gen o secuencia diana. Por lo tanto, el ARN interferente se refiere al ARN monocatenario que es complementario de una secuencia de ARNm diana o del ARN bicatenario formado por dos cadenas complementarias o por una única cadena autocomplementaria. El ARN interferente puede tener una identidad sustancial o completa con el gen o secuencia diana, o puede comprender una región de emparejamiento erróneo (es decir, un motivo de emparejamiento erróneo). La secuencia del ARN interferente puede corresponder al gen diana de longitud completa, o una subsecuencia de este. Preferiblemente, las moléculas de ARN interferentes se sintetizan químicamente.

El ARN interferente incluye "ARN interferente pequeño" o "ARNip" p. ej., ARN interferente de aproximadamente 15-60, 15-50 o 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más típicamente aproximadamente de 15-30, 15-25 o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud, y es preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (p. ej., cada secuencia complementaria del ARNip bicatenario es de 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, preferiblemente aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud, y el ARNip bicatenario tiene una longitud de aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 pares de bases de longitud, preferiblemente aproximadamente 18-22, 19-20 o 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARNip pueden comprender extremos salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos y extremos 5' fosfato. Los ejemplos de ARNip incluyen, sin limitación, una molécula de polinucleótido de doble cadena ensamblada a partir de dos moléculas de cadenas separadas, en donde una cadena es la cadena codificante y la otra es la cadena antiparalela complementaria; una molécula de polinucleótido bicatenaria ensamblada a partir de una molécula monocatenaria, donde las regiones codificante y antiparalela están unidas por un conector basado en ácido nucleico o no basado en ácido nucleico; una molécula de polinucleótido de doble cadena con una estructura secundaria de horquilla que tiene regiones codificante y antiparalela autocomplementarias; y una molécula de polinucleótido circular monocatenaria con dos o más estructuras de bucle y un tallo que tiene regiones codificante y antiparalela autocomplementarias, donde el polinucleótido circular se puede procesar in vivo o in vitro para generar una molécula de ARNip bicatenario activo.

Preferiblemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los ARNip también puede ser generado por escisión de ARNbc más largos (p. ej., ARNbc mayor de aproximadamente 25 nucleótidos de longitud) con la RNasa III o Dicer de *E. coli*. Estas enzimas procesan los ARNbc en ARNip biológicamente activos (véase, por ejemplo, Yang et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 99: 9942-9947 (2002); Calegari et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 99: 14236 (2002); Byrom et al., *Ambion TechNotes*, 10 (1): 4-6 (2003); Kawasaki et al., *Nucleic Acids Res.*, 31: 981-987 (2003); Knight et al., *Science*, 293: 2269-2271 (2001); y Robertson et al., *J. Biol. Chem.*, 243: 82 (1968)). Preferiblemente, los ARNbc tienen al menos 50 nucleótidos a aproximadamente 100, 200, 300, 400 o 500 nucleótidos de longitud. Un ARNbc puede tener una longitud de 1000, 1500, 2000, 5000 nucleótidos, o más. El ARNbc puede codificar un transcrito de

gen completo o un transcrito de gen parcial. En ciertos casos, el ARNip puede ser codificado por un plásmido (p. ej., transcrito como secuencias que se pliegan automáticamente en dúplex con bucles de horquilla).

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

La frase "que inhibe la expresión de un gen diana" se refiere a la capacidad de un ARN interferente (p. ej., ARNip), u otro agente terapéutico, para silenciar, reducir o inhibir la expresión de un gen diana. Para examinar la extensión del silenciamiento génico, una muestra de ensayo (p. ej., una muestra de células en cultivo que expresan el gen diana) o un mamífero de ensayo (p. ej., un mamífero como un ser humano o un modelo animal tal como un roedor (p. ej., ratón) o un modelo primate no humano (p. ej., mono)) se pone en contacto con un ARN interferente (p. ej., ARNip) que silencia, reduce o inhibe la expresión del gen diana. La expresión del gen diana en la muestra de ensayo o animal de ensayo se compara con la expresión del gen diana en una muestra de control (p. ej., una muestra de células en cultivo que expresan el gen diana) o un mamífero de control (p. ej., un mamífero como un ser humano o un modelo animal tal como un roedor (p. ej., ratón) o moldeo de primate no humano (p. ej., mono)) que no se pone en contacto ni se le administra el ARN interferente (p. ej., ARNip). A la expresión del gen diana en una muestra de control o un mamífero de control se le puede asignar un valor de 100%. En realizaciones particulares, el silenciamiento, inhibición o reducción de la expresión de un gen diana se logra cuando el nivel de expresión del gen diana en la muestra de ensayo o el mamífero de ensayo respecto al nivel de expresión del gen diana en la muestra de control o el mamífero de control es aproximadamente 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 0%. En otras palabras, el ARN interferente (p. ej., ARNip) silencia, reduce o inhibe la expresión de un gen diana en al menos aproximadamente el 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100% en una muestra de ensayo o en un mamífero de ensayo con respecto al nivel de expresión del gen diana en una muestra de control o mamífero de control que no se ha puesto en contacto o no se le ha administrado el ARN interferente (p. ej., ARNip). Los ensayos adecuados para determinar el nivel de expresión del gen diana incluyen, sin limitación, el examen de los niveles de proteína o ARNm usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como, p. ej., transferencias en mancha, transferencias Northern, hibridación en el sitio, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la técnica.

Una "cantidad eficaz" o "cantidad terapéuticamente eficaz" de un agente activo o agente terapéutico tal como un ARN interferente es una cantidad suficiente para producir el efecto deseado, p. ej., una inhibición de la expresión de una secuencia diana en comparación con el nivel de expresión normal detectado en ausencia de un ARN interferente. La inhibición de la expresión de un gen diana o secuencia diana se logra cuando el valor obtenido con un ARN interferente con respecto al control es aproximadamente 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5% o 0%. Los ensayos adecuados para medir la expresión de un gen diana o secuencia diana incluyen: p. ej., examen de los niveles de proteína o ARN usando técnicas conocidas por los expertos en la técnica, tales como transferencias en mancha, transferencias Northern, hibridación en el sitio, ELISA, inmunoprecipitación, función enzimática, así como ensayos fenotípicos conocidos por los expertos en la técnica.

Por "disminuir", "disminución", "reducir" o "reducción" de una respuesta inmunitaria mediante un ARN interferente se entiende una disminución detectable de una respuesta inmunitaria a un ARN interferente dado (p. ej., un ARN interferente modificado) u otro agente terapéutico. La cantidad de disminución de una respuesta inmunitaria por un ARN interferente modificado se puede determinar con respecto al nivel de una respuesta inmunitaria en presencia de un ARN interferente no modificado. Una disminución detectable puede ser aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100% o más, más baja que la respuesta inmunitaria detectada en presencia del ARN interferente no modificado. Una disminución en la respuesta inmunitaria al ARN interferente se mide típicamente por una disminución en la producción de citoquinas (p. ej., IFN $\gamma$ , IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IL-6 o IL-12) por una célula respondedora in vitro o una disminución en la producción de citoquinas en los sueros de un sujeto mamífero después de la administración del ARN interferente.

Como se usa en la presente memoria, la expresión "célula respondedora" se refiere a una célula, preferiblemente una célula de mamífero, que produce una respuesta inmunitaria detectable cuando se pone en contacto con un ARN interferente inmunoestimulador tal como un ARNip no modificado. Las células respondedoras ilustrativas incluyen, p. ej., células dendríticas, macrófagos, células mononucleares de sangre periférica (PBMC), esplenocitos y similares. Las respuestas inmunitarias detectables incluyen, p. ej., producción de citoquinas o factores de crecimiento tales como TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TGF y sus combinaciones. Las respuestas inmunitarias detectables también incluyen, p. ej., inducción de la proteína inducida por interferón con ARNm con repeticiones tetratricopéptido 1 (IFIT1).

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

La frase "condiciones de hibridación restrictivas" se refiere a las condiciones en las que un ácido nucleico hibridará con su secuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias. Las secuencias más largas hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una extensa guía para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en Tijssen, *Techniques in Biochemistry and Molecular Biology--Hybridization with Nucleic Probes*, "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" (1993). En general, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean aproximadamente 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmico ( $T_m$ ) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definido. El  $T_m$  es la temperatura (a una fuerza iónica, pH y concentración nucleica definidas) a la cual 50% de las sondas complementarias de la diana hibridan con la secuencia diana en equilibrio (puesto que las secuencias diana están presentes en exceso, en el  $T_m$ , 50% de las sondas están ocupadas en equilibrio). También se pueden lograr condiciones restrictivas con la adición de agentes desestabilizantes tales como la formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es al menos dos veces la señal de fondo, preferiblemente 10 veces la hibridación de fondo.

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

Los ácidos nucleicos que no hibridan entre sí en condiciones restrictivas son todavía sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la degeneración de codones máxima permitida por el código genético. En dichos casos, los ácidos nucleicos típicamente hibridan en condiciones de hibridación moderadamente restrictivas. Las "condiciones de hibridación moderadamente restrictivas" ilustrativas incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es al menos el doble de la de fondo. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que se pueden usar condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de restricción similares. Se proporcionan directrices adicionales para determinar los parámetros de hibridación en numerosas referencias, p. ej., *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds.

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

Para la comparación de secuencias, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de una cualquiera de una serie de posiciones contiguas seleccionadas del grupo que consta de aproximadamente 5 a aproximadamente 60, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 45, más normalmente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30, en el que se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia de este número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alineen de manera óptima. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos en la técnica. Se puede realizar un alineamiento óptimo de secuencias para comparación, p. ej., por el algoritmo de homología local de Smith

y Waterman, *Adv. Appl. Math.*, 2: 482 (1981), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.*, 48: 443 (1970), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 85: 2444 (1988), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software de Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (Suplemento de 1995)).

Los ejemplos no limitantes de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia son los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul et al., *Nuc. Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1977) y Altschul et al., *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990), respectivamente. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST está disponible públicamente a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Otro ejemplo es un algoritmo de alineamiento global para determinar el porcentaje de identidad de secuencia, tal como el algoritmo de Needleman-Wunsch para alinear secuencias de proteínas o nucleótidos (p. ej., ARN).

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

El término "ácido nucleico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un polímero que contiene al menos dos desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos en forma mono o bicatenaria e incluye ADN y ARN. El ADN puede estar en forma de, p. ej., moléculas antiparalelas, ADN plasmídico, ADN precondensado, un producto de PCR, vectores (P1, PAC, BAC, YAC, cromosomas artificiales), casetes de expresión, secuencias quiméricas, ADN cromosómico o derivados y combinaciones de estos grupos. El ARN puede estar en forma de ARN interferente pequeño (ARNip), ARNbc sustrato de Dicer, ARN de horquilla corta (ARNhc), ARN interferente asimétrico (ARNai), microARN (miARN), ARNm, ARNt, ARNr, ARNt, ARN vírico (ARNv), ARN multivalente (ARN MV) y combinaciones de estos. Los ácidos nucleicos incluyen ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o restos o enlaces de la cadena principal modificados, que son sintéticos, naturales y no naturales, y que tienen propiedades de unión similares al ácido nucleico de referencia. Los ejemplos de dichos análogos incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforamidatos, metil-fosfonatos, metil-fosfonatos quirales, ribonucleótidos 2'-O-metilo y ácidos nucleicos peptídicos (PNA). A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente sus variantes modificadas de forma conservadora (p. ej., sustituciones de codones degenerados), alelos, ortólogos, SNP y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) se sustituye por restos de base mixta y/o desoxiinosina (Batzer et al., *Nucleic Acid Res.*, 19: 5081 (1991).); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.*, 260: 2605-2608 (1985); Rossolini et al., *Mol. Cell Probes*, 8: 91-98 (1994)). Los "nucleótidos" contienen un azúcar desoxirribosa (ADN) o ribosa (ARN), una base y un grupo fosfato. Los nucleótidos están unidos entre sí por grupos fosfato. Las "bases" incluyen purinas y pirimidinas, que incluyen además los compuestos naturales adenina, timina, guanina, citosina, uracilo, inosina y análogos naturales, y derivados sintéticos de purinas y pirimidinas, que incluyen, pero no se limitan a modificaciones que ponen nuevos grupos reactivos tales como, pero no limitados a aminas, alcoholes, tioles, carboxilatos y haluros de alquilo.

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

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

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

El término "partícula lipídica" incluye una formulación lipídica que se puede usar para suministrar un agente activo o agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (p. ej., un ARN interferente), en un sitio diana de interés (p. ej., célula, tejido, órgano, y similares). En realizaciones preferidas, la partícula lipídica descrita en la presente memoria es una

nanopartícula lipídica, que se forma típicamente a partir de un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y opcionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de la partícula. En otras realizaciones preferidas, que pueden denominarse "partículas de ácido nucleico-lípido", el agente activo o agente terapéutico, tal como un ácido nucleico, se puede encapsular en la parte lipídica de la partícula, protegiéndola así de la degradación enzimática.

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término "LNP" se refiere a una nanopartícula lipídica. Un LNP representa una partícula hecha de lípidos (p. ej., un lípido catiónico, un lípido no catiónico, y opcionalmente un lípido conjugado que evita la agregación de la partícula), en donde el ácido nucleico (p. ej., un ARN interferente) está completamente encapsulado dentro del lípido. En ciertos casos, las LNP son extremadamente útiles para aplicaciones sistémicas, ya que pueden presentar tiempos de vida en la circulación prolongados después de inyección intravenosa (i.v.), se pueden acumular en sitios distales (p. ej., sitios físicamente separados del sitio de administración), y pueden mediar el silenciamiento de la expresión del gen diana en estos sitios distales. El ácido nucleico puede formar complejo con un agente de condensación y encapsular dentro de un LNP como se expone en la publicación PCT n° WO 00/03683.

- 15 Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) típicamente tienen un diámetro medio de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, o aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm o 150 nm, y son sustancialmente no tóxicas. Además, los ácidos nucleicos, cuando están presentes en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, son resistentes en solución acuosa a la degradación por una nucleasa. Las nanopartículas lipídicas y su método de preparación se describen, p. ej., en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0142025 y 2007/0042031.

- 25 Como se usa en la presente memoria, "lípido encapsulado" se puede referir a una partícula lipídica que proporciona un agente activo o agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (p. ej., un ARN interferente), con encapsulación completa, encapsulación parcial, o ambos. En una realización preferida, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica (p. ej., para formar una LNP).

- 30 El término "conjugado lipídico" se refiere a un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas lipídicas. Dichos conjugados de lípidos incluyen, pero no se limitan a conjugados de PEG-lípido tales como, p. ej., PEG acoplado a dialquiloilpropilos (p. ej., conjugados de PEG-DAA), PEG acoplado a diacilgliceroles (p. ej., conjugados de PEG-DAG), PEG acoplado a colesterol, PEG acoplado a fosfatidiletanolaminas y PEG conjugado a ceramidas (véase, p. ej., patente de EE.UU. n° 5.885.613), lípidos PEG catiónicos, conjugados de polioxazolina (POZ)-lípidos, oligómeros de poliamida (p. ej., conjugados de ATTA-lípido), y mezclas de estos. Ejemplos adicionales de conjugados de POZ-lípidos se describen en la publicación PCT n° WO 2010/006282. PEG o POZ se pueden conjugar directamente con el lípido o se pueden unir al lípido a través de un resto conector. Se puede usar cualquier resto conector adecuado para acoplar PEG o POZ a un lípido, incluyendo, p. ej., restos conectores que no contienen éster y restos conectores que contienen éster. En ciertas realizaciones preferidas, se usan restos conectores que no contienen éster, tales como amidas o carbamatos.

- 40 La expresión "lípido anfipático" se refiere, en parte, a cualquier material adecuado en donde la parte hidrófoba del material lipídico se orienta hacia una fase hidrófoba, mientras que la parte hidrófila se orienta hacia la fase acuosa. Las características hidrófilas proceden de la presencia de grupos polares o cargados, tales como hidratos de carbono, fosfato, carboxílico, sulfato, amino, sulfhidrilo, nitro, hidroxilo y otros grupos similares. La hidrofobicidad puede ser conferida por la inclusión de grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a grupos de hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y dichos grupos sustituidos con uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplos de compuestos anfipáticos incluyen, pero no se limitan a fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos.

- 45 Los ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen, pero no se limitan a fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoil-fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina y dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos que carecen de fósforo, tales como esfingolípidos, familias de glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y  $\beta$ -aciloxiácidos, también están dentro del grupo designado como lípidos anfipáticos. Además, los lípidos anfipáticos descritos antes se pueden mezclar con otros lípidos, incluyendo triglicéridos y esteroides.

- 55 La expresión "lípido neutro" se refiere a cualquiera de una serie de especies de lípidos que existen en una forma de ion híbrido no cargada o neutra a un pH seleccionado. A pH fisiológico, dichos lípidos incluyen, por ejemplo, diacilfosfatidilcolina, diacilfosfatidiletanolamina, ceramida, esfingomiélna, cefalina, colesterol, cerebrósidos y diacilgliceroles.



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

La expresión "lípidio aniónico" se refiere a cualquier lípidio que tiene carga negativa a pH fisiológico. Estos lípidos incluyen, pero no se limitan a fosfatidilgliceroles, cardiolipinas, diacilfosfatidilserinas, ácidos diacilfosfatídicos, N-dodecanoil-fosfatidiletanolaminas, N-succinil-fosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilgliceroles, palmitoiloleilfosfatidilglicerol (POPG), y otros grupos modificadores aniónicos unidos a lípidos neutros.

La expresión "lípidio hidrófobo" se refiere a compuestos que tienen grupos apolares que incluyen, pero no se limitan a grupos hidrocarburos alifáticos saturados e insaturados de cadena larga y dichos grupos opcionalmente sustituidos con uno o más grupos aromáticos, cicloalifáticos o heterocíclicos. Los ejemplos adecuados incluyen, pero no se limitan a diacilglicerol, dialquilglicerol, N-N-dialquilamino, 1,2-diaciloxi-3-aminopropano y 1,2-dialquil-3-aminopropano.

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

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

Como se usa en la presente memoria, la expresión "solución lipídica orgánica" se refiere a una composición que comprende un disolvente orgánico que tiene un lípidio, en su totalidad, o en parte.

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

"Suero estable" en relación con las partículas de ácido nucleico-lípidio tales como LNP significa que la partícula no se degrada significativamente después de la exposición a un suero o ensayo de nucleasa que degradaría significativamente el ADN o ARN libres. Los ensayos adecuados incluyen, por ejemplo, un ensayo de suero estándar, un ensayo de ADNasa o un ensayo de ARNasa.

"Suministro sistémico", como se usa en la presente memoria, se refiere al suministro de partículas lipídicas que conduce a una amplia biodistribución de un agente activo tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip) dentro de un organismo. Algunas técnicas de administración pueden conducir a la administración sistémica de ciertos agentes, pero no de otros. La administración sistémica significa que una cantidad útil, preferiblemente terapéutica, de un agente se expone a la mayoría de las partes del cuerpo. La obtención de una amplia biodistribución en general requiere una vida útil en la sangre de modo que el agente no se degrade o elimine rápidamente (tal como por órganos de primer paso (hígado, pulmón, etc.) o por la unión celular rápida, inespecífica) antes de alcanzar un sitio de enfermedad distal al sitio de administración. El suministro sistémico de partículas lipídicas puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, por ejemplo, intravenoso, subcutáneo e intraperitoneal. En una realización preferida, la administración sistémica de partículas lipídicas es por administración intravenosa.

"Suministro local", como se usa en la presente memoria, se refiere al suministro de un agente activo tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip) directamente a un sitio diana dentro de un organismo. Por ejemplo, un agente se puede suministrar localmente mediante inyección directa en un sitio de enfermedad, como un tumor u otro sitio diana, tal como un sitio de inflamación o un órgano diana tal como el hígado, corazón, páncreas, riñón y similares.

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

El término "cáncer" se refiere a cualquier miembro de una clase de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de células aberrantes. El término incluye todos los cánceres conocidos y afecciones neoplásicas, sean caracterizados como malignos, benignos, de tejido blando o sólidos, y cánceres de todas las etapas y grados, incluyendo los cánceres pre- y post-metastásicos. Los ejemplos de diferentes tipos de cáncer incluyen, pero no se limitan a cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer anal, cáncer de vías biliares, cáncer de intestino delgado, cáncer de estómago (gástrico), cáncer de esófago; cáncer de vesícula biliar, cáncer pancreático, cáncer de apéndice, cáncer de mama, cáncer de ovario; cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer renal (p. ej., carcinoma de células renales), cáncer del sistema nervioso central, glioblastoma, cáncer de piel, linfomas, coriocarcinomas, cánceres de cabeza y cuello, sarcomas osteogénicos y cánceres de la sangre. Los ejemplos no limitantes de tipos específicos de cáncer de hígado incluyen el carcinoma hepatocelular (CHC), el cáncer de hígado secundario (p.ej., causado por metástasis de algún otro tipo de célula de cáncer no hepática) y hepatoblastoma. Como se usa en la presente memoria, un "tumor" comprende una o más células cancerosas.

El término "ARN multivalente", abreviado como "ARN MV", se refiere a un complejo de polinucleótidos compuesto por al menos tres polinucleótidos, en donde cada polinucleótido hibrida, a lo largo de toda o parte de su longitud, con al menos dos de los otros polinucleótidos del complejo y en donde uno o más de los polinucleótidos incluye

opcionalmente una región de direccionamiento que es capaz de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana. Cada polinucleótido puede tener, por ejemplo, de 10 a 60 nucleótidos de longitud. La(s) región(es) de direccionamiento dentro de un polinucleótido pueden ser capaces de hibridar con una secuencia de ácido nucleico diana que es igual o diferente de la(s) secuencia(s) de ácido nucleico diana con la(s) que hibrida la(s) región(es) de direccionamiento de los otros polinucleótidos del complejo. Se puede sintetizar un ARN multivalente in vitro (p. ej., por síntesis química) o, por ejemplo, se puede procesar a partir de un precursor dentro de una célula viva. Por ejemplo, un precursor puede ser un polinucleótido lineal que incluye cada uno de los polinucleótidos del ARN multivalente, que se introduce en una célula viva y se escinde en la misma para formar un ARN multivalente. El término "ARN multivalente" incluye dicho precursor que se pretende que se escinda dentro de una célula viva. El término "ARN multivalente" también abarca, a modo de ejemplo, los complejos de polinucleótidos tripartitos descritos, específica o genéricamente, en la solicitud de patente internacional publicada que tiene el número de solicitud internacional PCT/US2010/036962.

### III. Nuevos lípidos catiónicos

Se describen en la presente memoria, entre otros, nuevos lípidos catiónicos (amino) que se pueden usar ventajosamente en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria para el suministro in vitro y/o in vivo de agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos a las células. Los nuevos lípidos catiónicos descritos en la presente memoria tienen las estructuras expuestas en la fórmula I en la presente memoria, e incluyen sus enantiómeros (R) y/o (S).

En algunas realizaciones, un lípido descrito en la presente memoria comprende una mezcla racémica. En otras realizaciones, un lípido descrito en la presente memoria comprende una mezcla de uno o más diastereoisómeros. En ciertas realizaciones, un lípido descrito en la presente memoria está enriquecido en un enantiómero, de modo que el lípido comprende al menos aproximadamente 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de exceso enantiomérico. En ciertas otras realizaciones, un lípido descrito en la presente memoria está enriquecido en un diastereoisómero, de manera que el lípido comprende al menos aproximadamente el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de exceso diastereoisomérico. En ciertas realizaciones adicionales, un lípido de la presente invención es quiralmente puro (p. ej., comprende un solo isómero óptico). En realizaciones adicionales, un lípido descrito en la presente memoria está enriquecido en un isómero óptico (p. ej., un isómero ópticamente activo), de modo que el lípido comprende al menos aproximadamente el 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de exceso isomérico. En la presente memoria se describe la síntesis de los lípidos catiónicos de fórmula I como una mezcla racémica o en forma ópticamente pura.

Las expresiones "lípido catiónico" y "amino-lípido" se usan de forma intercambiable en la presente memoria para incluir los lípidos y sus sales, p. ej., sales farmacéuticamente aceptables, que tienen una, dos, tres o más cadenas de ácidos grasos o alquilos grasos y un grupo de cabeza amino a pH valorable (p. ej., un grupo de cabeza alquilamino o dialquilamino). El lípido catiónico típicamente está protonado (es decir, cargado positivamente) a un pH inferior al pKa del lípido catiónico y es sustancialmente neutro a un pH por encima del pKa. Los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria también se pueden denominar lípidos catiónicos valorables.

El término "sales" incluye cualquier complejo aniónico y catiónico, tal como el complejo formado entre un lípido catiónico descrito en la presente memoria y uno o más aniones. Ejemplos no limitantes de aniones incluyen aniones inorgánicos y orgánicos, p. ej., hidruro, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, oxalato (p. ej., hemioxalato), fosfato, fosfonato, hidrogenofosfato, dihidrogenofosfato, óxido, carbonato, bicarbonato, nitrato, nitrito, nitrato, bisulfato, sulfuro, sulfato, bisulfato, sulfato, tiosulfato, hidrogenosulfato, borato, formiato, acetato, benzoato, citrato, tartrato, lactato, acrilato, poliacrilato, fumarato, maleato, itaconato, glicolato, gluconato, malato, mandelato, tiolato, ascorbato, salicilato, polimetacrilato, perclorato, clorato, clorito, hipoclorito, bromato, hipobromito, yodato, un alcanosulfonato, un arilsulfonato, arseniato, arsenito, cromato, dicromato, cianuro, cianato, tiocianato, hidróxido, peróxido, permanganato y sus mezclas. En realizaciones particulares, las sales de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria son sales cristalinas. En realizaciones particulares, "sales" son "sales farmacéuticamente aceptables".

La expresión "sales farmacéuticamente aceptables" se refiere a sales farmacéuticamente aceptables de un compuesto, cuyas sales derivan de una variedad de contraiones orgánicos e inorgánicos bien conocidos en la técnica. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen tanto las sales metálicas (inorgánicas) como las sales orgánicas, incluyendo, pero no limitadas a las citadas en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 17ª edición, pág. 1418 (1985). Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, solo a modo de ejemplo, sales de ácidos inorgánicos tales como hidrocloreto, sulfato, fosfato, difosfato, hidrobromuro y nitrato, o sales de un ácido orgánico tales como malato, maleato, fumarato, tartrato, succinato, citrato, acetato, lactato, metanosulfonato, p-toluenosulfonato o palmoato, salicilato y estearato. De manera similar, los cationes farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a sodio, potasio, calcio, aluminio, litio y amonio (en especial, sales de amonio con aminas secundarias). Las sales particulares descritas en la presente memoria por las razones citadas anteriormente incluyen sales de potasio, sodio, calcio y amonio.

El término "alquilo" incluye un hidrocarburo alifático saturado de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, que contiene de 1 a 24 átomos de carbono. Los alquilos de cadena lineal saturados representativos incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, *n*-propilo, *n*-butilo, *n*-pentilo, *n*-hexilo, y similares, mientras que los alquilos ramificados

saturados incluyen, sin limitación, isopropilo, *sec*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, isopentilo, y similares. Los alquilos cíclicos saturados representativos incluyen, pero no se limitan a los cicloalquilos  $C_{3-8}$  descritos en la presente memoria, mientras que los alquilos cíclicos insaturados incluyen, pero no se limita a los cicloalquenos  $C_{3-8}$  descritos en la presente memoria.

5 El término "heteroalquilo" incluye un hidrocarburo alifático saturado, de cadena lineal o ramificada, no cíclico o cíclico, como se ha definido antes, que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 heteroátomos (es decir, 1, 2, 3, 4, o 5 heteroátomos) tales como, por ejemplo, O, N, Si y/o S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El grupo heteroalquilo puede estar unido al resto de la molécula por un átomo de carbono o un heteroátomo.

10 La expresión "alquilo cíclico" incluye cualquiera de los grupos cicloalquilo, heterocicloalquilo, cicloalqueno y heterocicloalqueno sustituidos o no sustituidos que se describen a continuación.

15 El término "cicloalquilo" incluye un grupo alquilo cíclico sustituido o no sustituido que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono) como vértices del anillo. Los grupos cicloalquilo preferidos incluyen los que tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 átomos de carbono como vértices del anillo. Los ejemplos de grupos cicloalquilo  $C_{3-8}$  incluyen, pero no se limitan a ciclopropilo, metil-ciclopropilo, dimetil-ciclopropilo, ciclobutilo, metil-ciclobutilo, ciclopentilo, metil-ciclopentilo, ciclohexilo, metil-ciclohexilo, dimetil-ciclohexilo, cicloheptilo y ciclooctilo, así como otros grupos cicloalquilo  $C_{3-8}$  sustituidos.

20 El término "heterocicloalquilo" incluye un grupo alquilo cíclico sustituido o no sustituido como se ha definido antes que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 heteroátomos como miembros del anillo seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El grupo heterocicloalquilo puede estar unido al resto de la molécula a través de un átomo de carbono o un heteroátomo.

25 El término "cicloalqueno" incluye un grupo alqueno cíclico sustituido o no sustituido que tiene de aproximadamente 3 a aproximadamente 8 átomos de carbono (es decir, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 átomos de carbono) como vértices del anillo. Los grupos cicloalqueno preferidos son los que tienen de aproximadamente 3 a aproximadamente 6 átomos de carbono como vértices del anillo. Los ejemplos de grupos cicloalqueno  $C_{3-8}$  incluyen, pero no se limitan a ciclopropeno, metil-ciclopropeno, dimetil-ciclopropeno, ciclobuteno, ciclopenteno, ciclohexeno, ciclohepteno, y cicloocteno, así como otros grupos cicloalqueno  $C_{3-8}$  sustituidos.

30 El término "heterocicloalqueno" incluye un grupo alqueno cíclico sustituido o no sustituido como se ha definido antes que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 heteroátomos como miembros del anillo seleccionados del grupo que consiste en O, N, Si y S, en donde los átomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado. El grupo heterocicloalqueno puede estar unido al resto de la molécula por un átomo de carbono o un heteroátomo.

35 El término "alcoxi" incluye un grupo de la fórmula alquil-O-, en donde "alquilo" tiene la definición dada previamente. Los ejemplos no limitantes de grupos alcoxi incluyen metoxi, etoxi, *n*-propoxi, *iso*-propoxi, *n*-butoxi, *iso*-butoxi, *sec*-butoxi y *terc*-butoxi.

40 El término "alqueno" incluye un alquilo, como se ha definido antes, que contiene al menos un doble enlace entre los átomos de carbono adyacentes. Los alquenos incluyen isómeros tanto *cis* como *trans*. Los alquenos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen, pero no se limitan a etileno, propileno, 1-butenilo, 2-butenilo, isobutileno, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-metil-1-butenilo, 2-metil-2-butenilo, 2,3-dimetil-2-butenilo, y similares. Los alquenos cíclicos representativos se han descrito antes.

45 El término "alquino" incluye cualquier alquilo o alqueno, como se ha definido antes, que contiene adicionalmente al menos un triple enlace entre carbonos adyacentes. Los alquinos de cadena lineal y ramificada representativos incluyen, sin limitación, acetileno, propino, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, 2-pentinilo, 3-metil-1-butinilo, y similares.

50 El término "arilo" incluye un grupo hidrocarbonado poliinsaturado, típicamente aromático, que puede ser un solo anillo o múltiples anillos (hasta tres anillos) que están condensados entre sí o unidos de forma covalente, y que llevan opcionalmente uno o más sustituyentes, tales como por ejemplo, halógeno, trifluorometilo, amino, alquilo, alcoxi, alquilcarbonilo, ciano, carbamoilo, alcoxycarbamoilo, metilendioxi, carboxi, alcoxycarbonilo, aminocarbonilo, alquilaminocarbonilo, dialquilaminocarbonilo, hidroxilo, nitro, y similares. Los ejemplos no limitantes de grupos arilo no sustituidos incluyen fenilo, naftilo y bifenilo. Los ejemplos de grupos arilo sustituidos incluyen, pero no se limitan a fenilo, clorofenilo, trifluorometilfenilo, clorofluorofenilo y aminofenilo.

55 Los términos "alquilitio", "alquilsulfonilo", "alquilsulfínilo" y "arilsulfonilo" incluyen grupos que tienen la fórmula  $-S-R^i$ ,  $-S(O)_2-R^i$ ,  $-S(O)-R^i$  y  $-S(O)_2R^i$ , respectivamente, en donde  $R^i$  es un grupo alquilo como se ha definido previamente y  $R^j$  Es un grupo arilo como se ha definido previamente.

Los términos "alqueniloxi" y "alquiniloxi" incluyen grupos que tienen la fórmula  $-O-R^i$ , en donde  $R^i$  es un grupo alquenilo o alquinilo, respectivamente.

Los términos "alqueniltio" y "alquiniltio" incluyen grupos que tienen la fórmula  $-S-R^k$ , en donde  $R^k$  es un grupo alquenilo o alquinilo, respectivamente.

- 5 El término "alcoxicarbonilo" incluye un grupo que tiene la fórmula  $-C(O)O-R^i$ , en donde  $R^i$  es un grupo alquilo como se ha definido antes y en donde el número total de átomos de carbono se refiere a los restos alquilo y carbonilo combinados.

10 El término "acilo" incluye cualquier alquilo, alquenilo o alquinilo en donde el carbono en el punto de unión está sustituido con un grupo oxo, como se define más adelante. Los siguientes son ejemplos no limitantes de grupos acilo:  $-C(=O)$ alquilo,  $-C(=O)$ alquenilo y  $-C(=O)$ alquinilo.

15 El término "heterociclo" incluye un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros o bicíclico de 7 a 10 miembros que es saturado, insaturado o aromático, y que contiene 1 o 2 heteroátomos seleccionados independientemente de nitrógeno, oxígeno y azufre, y en donde los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados, y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, que incluyen anillos bicíclicos en los que cualquiera de los heterociclos anteriores está condensado con un anillo de benceno. El heterociclo puede estar unido por cualquier heteroátomo o átomo de carbono. Los heterociclos incluyen, pero no se limitan a heteroarilos como se definen a continuación, así como morfolinilo, pirrolidinonilo, pirrolidinilo, piperidinilo, piperizinilo, hidantoinilo, valerolactamilo, oxiranilo, oxetanilo, tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, tetrahidropiridinilo, tetrahidroprimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, tetrahidropirimidinilo, tetrahidrotiofenilo, tetrahidrotiopiranilo, y similares.

20 El término "heteroarilo" incluye un heterociclo aromático de 5 a 10 miembros que contiene uno, dos o más heteroátomos seleccionados de nitrógeno (N), oxígeno (O) y azufre (S). El heteroarilo puede estar sustituido en uno o más átomos de carbono con sustituyentes tales como, por ejemplo, halógeno, alquilo, alcoxi, ciano, halogenoalquilo (p. ej., trifluorometilo), heterociclilo (p. ej., morfolinilo o pirrolidinilo), y similares. Los ejemplos no limitantes de heteroarilos incluyen piridinilo y furanilo.

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

30 Las expresiones "alquilo opcionalmente sustituido", "alquilo cíclico 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 se sustituye por un sustituyente. En el caso de un sustituyente "oxo" (= O), se sustituyen dos átomos de hidrógeno. Los ejemplos no limitantes de sustituyentes incluyen oxo, halógeno, heterociclo,  $-CN$ ,  $-OR^x$ ,  $-NR^xR^y$ ,  $-NR^xC(=O)R^y$ ,  $-NR^xSO_2R^y$ ,  $-C(=O)R^x$ ,  $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$  y  $-SO_nNR^xR^y$ , en donde n es 0, 1 o 2,  $R^x$  y  $R^y$  son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de los sustituyentes alquilo y heterociclo puede estar además sustituido con uno o más de oxo, halógeno,  $-OH$ ,  $-CN$ , alquilo,  $-OR^x$ , heterociclo,  $-NR^xR^y$ ,  $NR^xC(=O)R^y$ ,  $-NR^xSO_2R^y$ ,  $-C(=O)R^x$ ,  $-C(=O)OR^x$ ,  $-C(=O)NR^xR^y$ ,  $-SO_nR^x$ , y  $-SO_nNR^xR^y$ . La expresión "opcionalmente sustituido", cuando se usa antes de una lista de sustituyentes, significa que cada uno de los sustituyentes en la lista puede estar opcionalmente sustituido como se describe en la presente memoria.

En un aspecto, se describe en la presente memoria un lípido catiónico que tiene una fórmula estructural (I):



40 (I)

o sus sales, en donde:

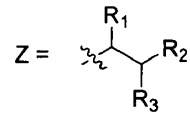
X es alquilamino;

A es alquilo  $C_1$  a  $C_6$  opcionalmente sustituido, en donde dicho alquilo  $C_1$  a  $C_6$  opcionalmente sustituido puede ser saturado o insaturado, y en donde A puede estar presente o no;

45 Y se selecciona del grupo que consiste en cetil, éster, carbamato opcionalmente sustituido, éter, y amida opcionalmente sustituida; y

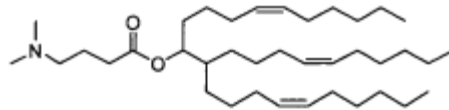
Z es un resto hidrófobo que consta de tres cadenas de alquilo en donde cada una de las cadenas de alquilo tiene una longitud de  $C_8$  a  $C_{11}$ , en donde cada una de las tres cadenas de alquilo puede ser independientemente saturada o insaturada, y en donde cada una de las tres cadenas de alquilo está opcionalmente sustituida.

50 En algunas realizaciones de los lípidos de fórmula (I), Z tiene la fórmula:

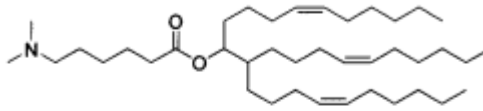


en donde,  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo  $C_8$  a  $C_{11}$ ; en donde cada uno de  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  puede ser independientemente saturado o insaturado; y en donde cada uno de  $R_1$ ,  $R_2$  y  $R_3$  está opcionalmente sustituido.

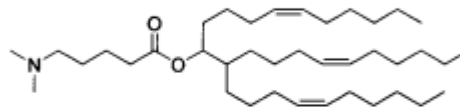
- 5 En realizaciones particulares, un lípido de fórmula (I) tiene una de las siguientes estructuras:



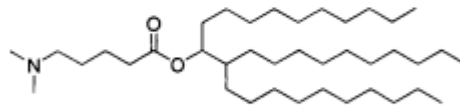
Compuesto 9,



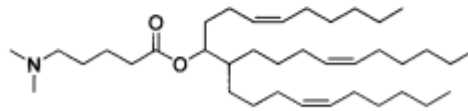
Compuesto 11,



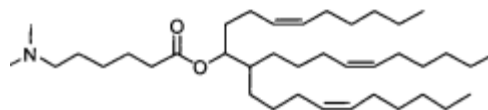
Compuesto 13,



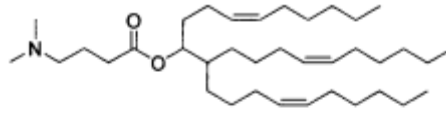
Compuesto 14,



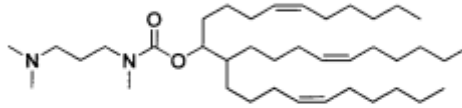
Compuesto 19,



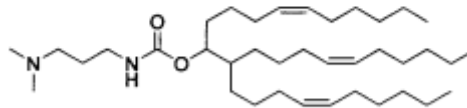
Compuesto 21,



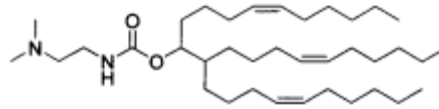
Compuesto 22,



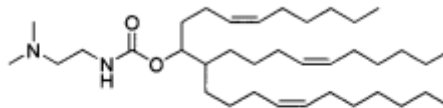
Compuesto 23,



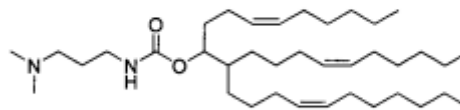
Compuesto 24,



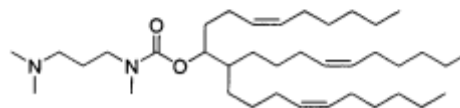
Compuesto 25,



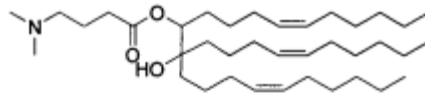
Compuesto 26,



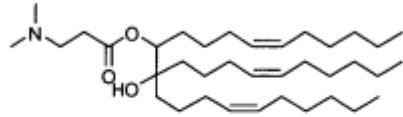
Compuesto 27,



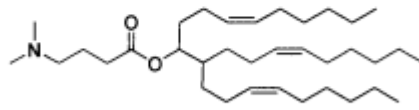
Compuesto 28,



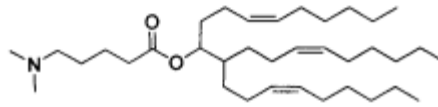
Compuesto 30,



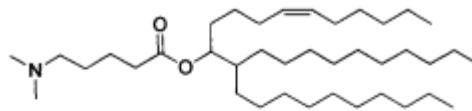
Compuesto 31,



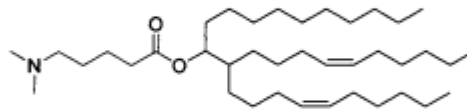
Compuesto 40,



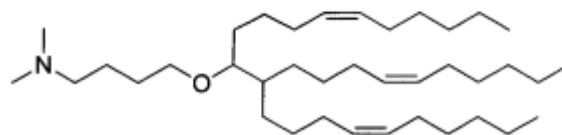
Compuesto 42,



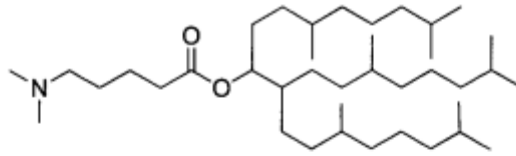
Compuesto 50,



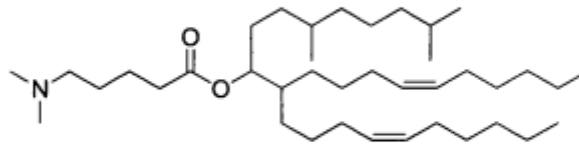
Compuesto 53,



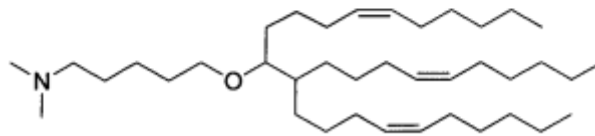
Compuesto 62,



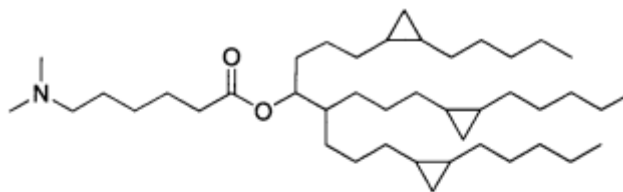
Compuesto 71,



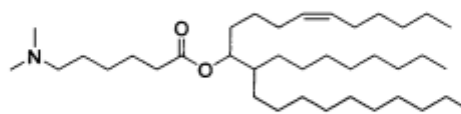
Compuesto 74,



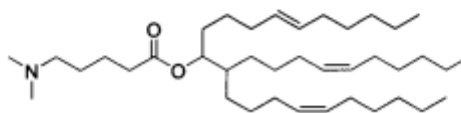
Compuesto 76,



Compuesto 79,

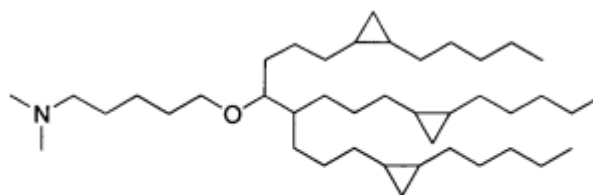


Compuesto 83,



Compuesto 89, o





Compuesto 90.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico forma una sal (p. ej., una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico es su sal de oxalato (p. ej., hemioxalato), que preferiblemente es una sal cristalina. En realizaciones particulares, el lípido catiónico forma una sal farmacéuticamente aceptable con uno o más aniones.

También están incluidas dentro del alcance de esta descripción formas cristalinas, hidratos y solvatos de los compuestos descritos en la presente memoria.

Los compuestos descritos en la presente memoria se pueden preparar por técnicas de síntesis orgánica conocidas, que incluyen los métodos descritos en los ejemplos. En algunas realizaciones, la síntesis de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria puede requerir el uso de grupos protectores. La metodología de grupos protectores es bien conocida por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, PROTECTIVE GRUPOS IN ORGANIC SYNTHESIS, Green, T.W. et. al., Wiley-Interscience, New York City, 1999). Brevemente, los grupos protectores dentro del contexto de esta descripción son cualquier grupo que reduce o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional. Se puede añadir un grupo protector a un grupo funcional para enmascarar su reactividad durante ciertas reacciones y después eliminar para poner de manifiesto el grupo funcional original. En ciertos casos, se usa un "grupo protector de alcohol". Un "grupo protector de alcohol" es cualquier grupo que disminuye o elimina la reactividad no deseada de un grupo funcional alcohol. Los grupos protectores se pueden añadir y eliminar usando técnicas bien conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria tienen al menos un grupo protonable o desprotonable, de modo que el lípido tiene carga positiva a un pH igual o inferior al pH fisiológico (p. ej., pH 7,4) y es neutro a un segundo pH, preferiblemente a un pH igual o superior al fisiológico. Un experto en la técnica entenderá que la adición o 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 todos los lípidos estén presentes en forma cargada o neutra. Los lípidos que tienen más de un grupo protonable o desprotonable, o que son iones híbridos, no están excluidos de su uso en la presente memoria.

En ciertas otras realizaciones, los lípidos protonables descritos en la presente memoria tienen un  $pK_a$  del grupo protonable en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 11. Lo más preferido es un  $pK_a$  de aproximadamente 4 a aproximadamente 7, debido a que estos lípidos serán catiónicos en una etapa de formulación a pH más bajo, mientras que las partículas se neutralizarán en gran parte (aunque no completamente) en la superficie a pH fisiológico de aproximadamente 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 a pH fisiológico y se eliminará por simple diálisis, reduciendo en gran medida la susceptibilidad de la partícula al aclaramiento.

#### IV. Agentes activos

Los agentes activos (p. ej., agentes terapéuticos) incluyen cualquier molécula o compuesto capaz de ejercer un efecto deseado en una célula, tejido, órgano o sujeto. Dichos efectos pueden ser, p. ej., biológico, fisiológico y/o cosmético. Los agentes activos pueden ser cualquier tipo de molécula o compuesto incluyendo, pero no limitado a ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, moléculas pequeñas y sus mezclas. Los ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos incluyen moléculas de ARN interferente (p. ej., ARNip, ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNis y/o miARN), oligonucleótidos antiparalelos, plásmidos, ribozimas, oligonucleótidos inmunoestimuladores y sus mezclas. Los ejemplos de péptidos o polipéptidos incluyen, sin limitación, anticuerpos (p. ej., anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos; anticuerpos humanizados, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos recombinantes y/o anticuerpos Primatized™), citoquinas, factores de crecimiento, factores apoptóticos, factores inductores de la diferenciación, receptores de superficie celular y sus ligandos, hormonas y sus mezclas. Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen, pero no se limitan a moléculas orgánicas pequeñas o compuestos tales como cualquier agente o fármaco convencional conocido por los expertos en la técnica.

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

realización, un derivado de agente terapéutico es un profármaco que carece de actividad terapéutica, pero se vuelve activo tras modificación adicional.

#### A. Ácidos nucleicos

5 En ciertas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria están asociadas con un ácido nucleico, dando como resultado una partícula de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP). En algunas realizaciones, el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica. Como se usa en la presente memoria, el término "ácido nucleico" incluye cualquier oligonucleótido o polinucleótido, con fragmentos que contienen hasta 60 nucleótidos en general denominados oligonucleótidos, y fragmentos más largos denominados polinucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos descritos en la presente memoria son de aproximadamente 15 a 10 aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. El ácido nucleico se puede administrar solo en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria o en combinación (p. ej., coadministrado) con partículas lipídicas descritas en la presente memoria que comprenden péptidos, polipéptidos o moléculas pequeñas, tales como fármacos convencionales.

15 En el contexto de esta descripción, los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" se refieren a un polímero u oligómero de monómeros nucleótidos o de nucleósidos que consiste en bases naturales, azúcares y enlaces entre azúcares (cadena principal). Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros no naturales, o partes de estos, que funcionan de manera similar. Dichos oligonucleótidos modificados o sustituidos a menudo son preferidos frente a formas naturales debido a propiedades tales como, por ejemplo, captación celular mejorada, inmunogenicidad reducida y estabilidad aumentada en 20 presencia de nucleasas.

Los oligonucleótidos se clasifican en general como desoxirribooligonucleótidos o ribooligonucleótidos. Un desoxirribooligonucleótido consiste en un azúcar de 5 carbonos llamado desoxirribosa unido covalentemente al fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero que alterna, no ramificado. Un ribooligonucleótido consiste en una estructura de repetición similar donde el azúcar de 5 carbonos es ribosa.

25 El ácido nucleico que está presente en una partícula de ácido nucleico-lípido descrita en la presente memoria incluye cualquier forma de ácido nucleico que sea conocida. Los ácidos nucleicos utilizados en la presente memoria pueden ser de ADN o ARN monocatenario, o ADN o ARN bicatenario, o híbridos de ADN-ARN. Los ejemplos de ADN bicatenario se describen en la presente memoria e incluyen, p. ej., genes estructurales, genes que incluyen regiones de control y terminación, y sistemas de autorreplicación tales como ADN vírico o plasmídico. Los ejemplos de ARN 30 bicatenario se describen en la presente memoria e incluyen, p. ej., ARNip y otros agentes de iARN, tales como el ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNia y pre-ARNm. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, p. ej., oligonucleótidos antiparalelos, ribozimas, miARN maduro y oligonucleótidos formadores de tríplex.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden ser de diferentes longitudes, que en general dependen de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes 35 pueden tener una longitud de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 100.000 restos de nucleótidos. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden estar en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. En varias realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, tanto monocatenarios, bicatenarios como de triple cadena, pueden tener una longitud en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 60 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos, de 40 aproximadamente 20 a aproximadamente 50 nucleótidos, de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 nucleótidos.

En realizaciones particulares, un oligonucleótido (o una cadena de este) descrito en la presente memoria hibrida específicamente o es complementario de una secuencia de polinucleótido diana. Las expresiones "que hibrida específicamente" y "complementario" como se usan en la presente memoria indican un grado suficiente de 45 complementariedad de modo que se produce una unión estable y específica entre la diana de ADN o ARN y el oligonucleótido. Se entiende que no es necesario que un oligonucleótido sea 100% complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para ser específicamente hibridable. En realizaciones preferidas, un oligonucleótido es específicamente hibridable cuando la unión del oligonucleótido a la secuencia diana interfiere con la función normal de la secuencia diana para causar una pérdida de utilidad o expresión de esta, y hay un grado suficiente de 50 complementariedad para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos in vivo o tratamiento terapéutico, o, en el caso de ensayos in vitro, en las condiciones en las que se llevan a cabo los ensayos. Por lo tanto, el oligonucleótido puede incluir 1, 2, 3 o más sustituciones de bases en comparación con la región de un gen o secuencia de ARNm a la que se dirige o con la que hibrida específicamente.

#### 55 1. ARNip

El componente de ARNip de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria es capaz de silenciar la expresión de un gen diana de interés. Cada cadena del dúplex de ARNip típicamente es de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 15 a

aproximadamente 30 nucleótidos. En ciertas realizaciones, el ARNip comprende al menos un nucleótido modificado. El ARNip modificado es en general menos inmunoestimulador que una secuencia de ARNip no modificada correspondiente y retiene la actividad de iARN contra el gen diana de interés. En algunas realizaciones, el ARNip modificado contiene al menos un nucleótido de 2'OMe-purina o pirimidina tal como un nucleótido 2'OMe-guanosina, 2'OMe-uridina, 2'OMe-adenosina y/o 2'OMe-citosina. Los nucleótidos modificados pueden estar presentes en una cadena (es decir, codificante o antiparalela) o ambas cadenas del ARNip. En algunas realizaciones preferidas, uno o más de los nucleótidos de uridina y/o guanosina están modificados (p. ej., 2'OMe-modificado) en una cadena (es decir, codificante o antiparalela) o ambas cadenas del ARNip. En estas realizaciones, el ARNip modificado puede comprender además uno o más nucleótidos de adenosina modificada (p. ej., 2'OMe-modificada) y/o citosina modificada (p. ej., 2'OMe-modificada). En otras realizaciones preferidas, solo se modifican los nucleótidos de uridina y/o guanosina (p. ej., 2'OMe-modificados) en una cadena (es decir, codificante o antiparalela) o ambas cadenas del ARNip. Las secuencias de ARNip pueden tener extremos salientes (p. ej., extremos salientes 3 o 5' como se describe en Elbashir et al., *Genes Dev.*, 15: 188 (2001) o Nykänen et al., *Cell*, 107: 309 (2001)), o puede carecer de extremos salientes (es decir, tienen extremos romos).

En realizaciones particulares, la incorporación selectiva de nucleótidos modificados tales como los nucleótidos 2'OMe-uridina y/o guanosina en la región de doble cadena de una o ambas cadenas del ARNip reduce o anula completamente la respuesta inmunitaria contra esa molécula de ARNip. En ciertos casos, las propiedades inmunoestimuladoras de las secuencias específicas de ARNip y su capacidad para silenciar la expresión de genes se pueden equilibrar u optimizar por la introducción de modificaciones mínimas y selectivas de 2'OMe dentro de la región de doble cadena del dúplex de ARNip. Esto se puede lograr con dosis de ARNip terapéuticamente viables sin inducción de citoquinas, toxicidad y efectos fuera del objetivo asociados con el uso de ARNip no modificado.

El ARNip modificado en general comprende de aproximadamente 1% a aproximadamente 100% (p. ej., aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17 %, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 100%) de nucleótidos modificados en la región de doble cadena del dúplex de ARNip. En ciertas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprenden nucleótidos modificados. En ciertas otras realizaciones, algunos o todos los nucleótidos modificados en la región de doble cadena del ARNip están 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más nucleótidos separados entre sí. En una realización preferida, ninguno de los nucleótidos modificados en la región de doble cadena del ARNip son adyacentes entre sí (p. ej., hay un espacio de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 nucleótidos no modificados entre cada nucleótido modificado).

En algunas realizaciones, menos de aproximadamente 50% (p. ej., menos de aproximadamente 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37% o 36%, preferiblemente menos de aproximadamente 35%, 34%, 33%, 32%, 31% o 30%) de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos modificados (p. ej., 2'OMe). En un aspecto de estas realizaciones, menos de aproximadamente 50% de los nucleótidos uridina y/o guanosina en la región de doble cadena de una o ambas cadenas del ARNip son modificados selectivamente (p. ej., solos). En otro aspecto de estas realizaciones, menos de aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región bicatenaria del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip, en donde el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido 2'OMe-uridina, y en donde los nucleótidos 2'OMe-guanosina y los nucleótidos 2'OMe-uridina son los únicos nucleótidos 2'OMe presentes en la región de doble cadena. En otro aspecto más de estas realizaciones, menos de aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip modificado, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, y sus mezclas, y en donde el ARNip no comprende nucleótidos 2'OMe-citosina en la región de doble cadena. En un aspecto adicional de estas realizaciones, menos de aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip, en donde el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido 2'OMe-uridina, y en donde el ARNip no comprende nucleótidos 2'OMe-citosina en la región de doble cadena. En otro aspecto de estas realizaciones, menos de aproximadamente el 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip modificado, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, y sus mezclas, y en donde los nucleótidos 2'OMe en la región de doble cadena no son adyacentes entre sí.

En otras realizaciones, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% (p. ej., de aproximadamente 5%-50%, 10%-50%, 15%-50%, 20%-50%, 25%-50%, 30%-50%, 35%-50%, 40%-50%, 45%-50%, 5%-45%, 10%-45%, 15%-45%, 20%-45%, 25%-45%, 30%-45%, 35%-45%, 40%-45%, 5%-40%, 10%-40%, 15%-40%, 20%-40%, 25%-40%, 25%-39%, 25%-38%, 25%-37%, 25%-36%, 26%-39%, 26%-38%, 26%-37%, 26%-36%, 27%-39%, 27%-38%, 27%-37%, 27%-36%, 28%-39%, 28%-38%, 28%-37%, 28%-36%, 29%-39%, 29%-38%, 29%-37%, 29%-36%, 30%-40%, 30%-39%, 30%-38%, 30%-37%, 30%-36%, 31%-39%, 31%-38%, 31%-37%, 31%-36%, 32%-39%, 32%-38%, 32%-37%, 32%-36%, 33%-39%, 33%-38%, 33%-37%, 33%-36%, 34%-39%, 34%-38%, 34%-37%, 34%-36%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 21%-35%, 22%-35%, 23%-35%, 24%-35%, 25%-35%, 26%-35%, 27%-

35%, 28%-35%, 29%-35%, 30%-35%, 31%-35%, 32%-35%, 33%-35%, 34%-35%, 30%-34%, 31%-34%, 32%-34%, 33%-34%, 30%-33%, 31%-33%, 32%-33%, 30%-32%, 31%-32%, 25%-34%, 25%-33%, 25%-32%, 25%-31%, 26%-34%, 26%-33%, 26%-32%, 26%-31%, 27%-34%, 27%-33%, 27%-32%, 27%-31%, 28%-34%, 28%-33%, 28%-32%, 28%-31%, 29%-34%, 29%-33%, 29%-32%, 29%-31%, 5%-30%, 10%-30%, 15%-30%, 20%-34%, 20%-33%, 20%-32%, 20%-31%, 20%-30%, 21%-30%, 22%-30%, 23%-30%, 24%-30%, 25%-30%, 25%-29%, 25%-28%, 25%-27%, 25%-26%, 26%-30%, 26%-29%, 26%-28%, 26%-27%, 27%-30%, 27%-29%, 27%-28%, 28%-30%, 28%-29%, 29%-30%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-29%, 20%-28%, 20%-27%, 20%-26%, 20%-25%, 5%-20%, 10%-20%, 15%-20%, 5%-15%, 10%-15% o 5%-10%) de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos modificados. En un aspecto de estas realizaciones, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% de los nucleótidos uridina y/o guanosina en la región de doble cadena de una o ambas cadenas del ARNip son modificados selectivamente (p. ej., solos). En otro aspecto de estas realizaciones, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip, en donde el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido 2'OMe-uridina, y en donde los nucleótidos 2'OMe-guanosina y nucleótidos 2'OMe-uridina son los únicos nucleótidos 2'OMe presentes en la región de doble cadena. En otro aspecto más de estas realizaciones, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprenden nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip modificado, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, y sus mezclas, y en donde el ARNip no comprende nucleótidos 2'OMe-citosina en la región de doble cadena. En un aspecto adicional de estas realizaciones, de aproximadamente el 1% a aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip, en donde el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'OMe-guanosina y al menos un nucleótido 2'OMe-uridina, y en donde el ARNip no comprende nucleótidos 2'OMe-citosina en la región de doble cadena. En otro aspecto de estas realizaciones, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprende nucleótidos 2'OMe, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe en ambas cadenas del ARNip modificado, en donde el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe seleccionados del grupo que consiste en nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, y sus mezclas, y en donde los nucleótidos 2'OMe en la doble cadena región no son adyacentes entre sí.

Los intervalos, porcentajes y patrones adicionales de modificaciones que se pueden introducir en el ARNip se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0135372.

#### a) Selección de secuencias de ARNip

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

Como un ejemplo no limitante, en la secuencia de nucleótidos 3' del codón de inicio AUG de un transcrito del gen diana de interés se pueden examinar las secuencias de dinucleótidos (p. ej., AA, NA, CC, GG o UU, donde N = C, G o U) (véase, por ejemplo, Elbashir et al., *EMBO J.*, 20: 6877-6888 (2001)). Los nucleótidos inmediatamente 3' a las secuencias de dinucleótidos se identifican como posibles secuencias de ARNip (es decir, una secuencia diana o una secuencia de cadena codificante). Típicamente, los 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, o más nucleótidos inmediatamente 3' a las secuencias de dinucleótidos se identifican como posibles secuencias de ARNip. En algunas realizaciones, la secuencia de dinucleótidos es una secuencia AA o NA y los 19 nucleótidos inmediatamente 3' al dinucleótido de AA o NA se identifican como potenciales secuencias de ARNip. Las secuencias de ARNip están normalmente espaciadas en diferentes posiciones a lo largo de la longitud del gen diana. Para potenciar aún más la eficacia de silenciamiento de las secuencias de ARNip, se pueden analizar las potenciales secuencias de ARNip para identificar sitios que no contienen regiones de homología con otras secuencias de codificación, p. ej., en la célula u organismo diana. Por ejemplo, una secuencia de ARNip adecuada de aproximadamente 21 pares de bases típicamente no tendrá más de 16-17 pares de bases contiguas de homología con las secuencias codificantes en la célula u organismo diana. Si las secuencias de ARNip deben expresarse a partir de un promotor de ARN Pol III, se seleccionan secuencias de ARNip que carecen de más de 4 A o T contiguas.

Una vez que se ha identificado una potencial secuencia de ARNip, se puede diseñar una secuencia complementaria (es decir, una secuencia de cadena antiparalela). Una potencial secuencia de ARNip también se puede analizar usando una variedad de criterios conocidos en la técnica. Por ejemplo, para potenciar su eficiencia de silenciamiento, las secuencias de ARNip se pueden analizar mediante un algoritmo de diseño racional para identificar secuencias que tengan una o más de las siguientes características: (1) contenido de G/C de aproximadamente 25% a aproximadamente 60% de G/C; (2) al menos 3 A/U en las posiciones 15-19 de la cadena codificante; (3) sin repeticiones internas; (4) una A en la posición 19 de la cadena codificante; (5) una A en la posición 3 de la cadena codificante; (6) una U en la posición 10 de la cadena codificante; (7) no G/C en la posición 19 de la cadena codificante; y (8) no G en la posición 13 de la cadena codificante. Las herramientas de diseño de ARNip que incorporan algoritmos que asignan valores adecuados de cada una de estas características y son útiles

para la selección de ARNip se pueden encontrar, p. ej., en <http://ihome.ust.hk/~bokcmho/siRNA/siRNA.html>. Un experto en la técnica apreciará que se pueden seleccionar secuencias con una o más de las características anteriores para análisis y ensayos adicionales como potenciales secuencias de ARNip.

Además, las potenciales secuencias de ARNip con uno o más de los siguientes criterios a menudo se pueden eliminar como ARNip: (1) secuencias que comprenden un tramo de 4 o más de esta base en una fila; (2) secuencias que comprenden homopolímeros de G (es decir, para reducir posibles efectos no específicos debido a características estructurales de estos polímeros); (3) secuencias que comprenden motivos de triple base (p. ej., GGG, CCC, AAA o TTT); (4) secuencias que comprenden tramos de 7 o más G/C en una fila; y (5) secuencias que comprenden repeticiones directas de 4 o más bases dentro de los candidatos que dan como resultado estructuras internas plegadas hacia atrás. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que todavía se pueden seleccionar secuencias con una o más de las características anteriores para análisis y ensayo adicionales como potenciales secuencias de ARNip.

En algunas realizaciones, las potenciales secuencias de ARNip se pueden analizar adicionalmente basándose en la asimetría del dúplex de ARNip como se describe en p. ej., Khvorova et al., *Cell*, 115: 209-216 (2003); y Schwarz et al., *Cell*, 115: 199-208 (2003). En otras realizaciones, las potenciales secuencias de ARNip se pueden analizar adicionalmente basándose en la estructura secundaria en el sitio diana como se describe, p. ej., en Luo et al., *Biophys. Res. Commun.*, 318: 303-310 (2004). Por ejemplo, la estructura secundaria en el sitio diana se puede modelar usando el algoritmo Mfold (disponible en [http://mfold.burnet.edu.au/rna\\_form](http://mfold.burnet.edu.au/rna_form)) para seleccionar secuencias de ARNip que favorezcan la accesibilidad en el sitio diana donde hay menos estructura secundaria en forma de emparejamiento de bases y tallo-bucles.

Una vez que se ha identificado una potencial secuencia de ARNip, se puede analizar en la secuencia la presencia de cualquier propiedad inmunoestimuladora. p. ej., usando un ensayo de citoquinas in vitro o un modelo animal in vivo. Los motivos en la cadena codificante y/o antiparalela de la secuencia de ARNip, tales como los motivos ricos en GU (p. ej., 5'-GU-3', 5'-UGU-3', 5'-GUGU-3', 5'-UGUGU-3', etc.) también pueden proporcionar una indicación de si la secuencia puede ser inmunoestimuladora. Una vez que se encuentra que una molécula de ARNip es inmunoestimuladora, se puede modificar para disminuir sus propiedades inmunoestimuladoras como se describe en la presente memoria. Como ejemplo no limitante, una secuencia de ARNip se puede poner en contacto con una célula respondedora de mamíferos en condiciones tales que la célula produzca una respuesta inmunitaria detectable para determinar si el ARNip es un ARNip inmunoestimulador o no inmunoestimulador. La célula respondedora de mamífero puede ser de un mamífero sin tratamiento previo (es decir, un mamífero que no se ha puesto previamente en contacto con el producto génico de la secuencia del ARNip). La célula respondedora de mamíferos puede ser, p. ej., una célula mononuclear de sangre periférica (PBMC), un macrófago y similares. La respuesta inmunitaria detectable puede comprender la producción de una citoquina o factor de crecimiento tales como, p. ej., TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12, o una combinación de estos. Una molécula de ARNip identificada como inmunoestimuladora después se puede modificar para disminuir sus propiedades inmunoestimuladoras sustituyendo al menos uno de los nucleótidos en la cadena codificante y/o antiparalela por nucleótidos modificados. Por ejemplo, menos de aproximadamente 30% (p. ej., menos de aproximadamente 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5%) de los nucleótidos en la región de doble cadena del dúplex de ARNip se puede sustituir por nucleótidos modificados como nucleótidos 2'OMe. El ARNip modificado después se puede poner en contacto con una célula respondedora de mamífero como se ha descrito antes para confirmar que sus propiedades inmunoestimulantes se han reducido o anulado.

Los ensayos in vitro adecuados para detectar una respuesta inmunitaria incluyen, pero no se limitan a la técnica de inmunoensayo en sándwich con anticuerpo monoclonal doble de David et al. (patente de EE.UU. n° 4.376.110); ensayos en sándwich de anticuerpos monoclonales-policlonales (Wide et al., en Kirkham y Hunter, eds., *Radioimmunoassay Methods*, E. y S. Livingstone, Edimburgo (1970)); el método de "transferencia Western" de Gordon et al. (patente de EE.UU. n° 4.452.901); Inmunoprecipitación de ligando marcado (Brown et al., *J. Biol. Chem.*, 255: 4980-4983 (1980)); ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) como describen, por ejemplo, Raines et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 5154-5160 (1982); técnicas inmunocitoquímicas, que incluyen el uso de fluorocromos (Brooks et al., *Clin. Exp. Immunol.*, 39: 477 (1980)); y neutralización de la actividad (Bowen-Pope et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81: 2396-2400 (1984)). Además de los inmunoensayos descritos antes, hay una serie de otros inmunoensayos disponibles, que incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. n° 3.817.827; 3.850.752; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; y 4.098.876.

Un ejemplo no limitante de un modelo in vivo para detectar una respuesta inmunitaria incluye un ensayo de inducción de citoquinas de ratón in vivo como se describe, p. ej., en Judge et al., *Mol. Ther.*, 13: 494-505 (2006). En ciertas realizaciones, el ensayo se puede llevar a cabo como sigue: (1) se puede administrar ARNip por inyección intravenosa estándar en la vena lateral de la cola; (2) se puede recoger sangre por punción cardíaca aproximadamente 6 horas después de la administración y procesar como plasma para el análisis de citoquinas; y (3) se pueden cuantificar las citoquinas usando kits ELISA en sándwich de acuerdo con las instrucciones del fabricante (p. ej., IFN- $\alpha$  de ratón y humano (PBL Biomedical; Piscataway, NJ); IL-6 y TNF- $\alpha$  humanos (eBioscience; San Diego, CA); e IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  de ratón (BD Biosciences; San Diego, CA)).

Los anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a citoquinas y factores de crecimiento están disponibles en el mercado a partir de múltiples fuentes y se pueden generar usando métodos conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Kohler et al., *Nature*, 256: 495-497 (1975) y Harlow y Lane, *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publication, New York (1999)). La generación de anticuerpos monoclonales se ha descrito previamente y se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica (Buhring et al., *En Hybridoma*, vol. 10, nº 1, pág. 77-78 (1991)). En algunos métodos, el anticuerpo monoclonal está marcado (p. ej., con cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, eléctricos, ópticos o químicos) para facilitar la detección.

#### b) Generación de moléculas de ARNip

El ARNip se puede proporcionar en varias formas que incluyen, p. ej., como uno o más dúplex aislados de ARN interferente pequeño (ARNip), como ARN bicatenario más largo (ARNbc), o como ARNip o ARNbc transcrito de un casete transcripcional en un plásmido de ADN. En algunas realizaciones, el ARNip se puede producir enzimáticamente o por síntesis orgánica parcial/total, y se pueden introducir ribonucleótidos modificados por síntesis enzimática u orgánica in vitro. En ciertos casos, cada cadena se prepara químicamente. Los métodos para sintetizar moléculas de ARN son conocidos en la técnica, p. ej., los métodos de síntesis química descritos en Verma y Eckstein (1998) o como se describe en la presente memoria.

Se puede usar una población de ARN para proporcionar ARN precursores largos, o ARN precursores largos que tienen una identidad sustancial o completa con una secuencia diana seleccionada para generar el ARNip. Los ARN se pueden aislar de células o tejidos, sintetizar y/o clonar de acuerdo con métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. El ARN puede ser una población mixta (obtenida de células o tejido, transcrita de ADNc, sustraída, seleccionada, etc.), o puede representar una sola secuencia diana. El ARN puede ser natural (p. ej., aislado de muestras de tejidos o células), sintetizado in vitro (p. ej., usando T7 o SP6 polimerasa y productos de PCR o un ADNc clonado), o sintetizado químicamente.

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

Los métodos para aislar ARN, sintetizar ARN, hibridar ácidos nucleicos, preparar y cribar bibliotecas de ADNc y llevar a cabo la PCR, son bien conocidos en la técnica (véase, p. ej., Gubler y Hoffman, *Gene*, 25: 263-269 (1983); Sambrook et al., véase antes; Ausubel et al., véase antes), como lo son los métodos de PCR (véase, patentes de EE.UU. nº 4.683.195 y 4.683.202; *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis et al., Eds, 1990)). Las bibliotecas de expresión también son bien conocidas por los expertos en la técnica. Los textos básicos adicionales que describen los métodos generales de uso en la presente memoria incluyen Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2ª ed. 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al., eds., 1994).

Preferiblemente, los ARNip se sintetizan químicamente. Los oligonucleótidos que comprenden las moléculas de ARNip descritas en la presente memoria se pueden sintetizar usando cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas en Usman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109: 7845 (1987); Scaringe et al., *Nucl. Acids Res.*, 18:5433 (1990); Wincott et al., *Nucl. Acids Res.*, 23:2677-2684 (1995); y Wincott et al., *Methods Mol. Bio.*, 74:59 (1997). La síntesis de oligonucleótidos usa grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos comunes, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5' y fosforamiditas en el extremo 3'. Como ejemplo no limitante, se pueden realizar síntesis a pequeña escala en un sintetizador de Applied Biosystems usando un protocolo de escala de 0,2 µmol. Alternativamente, las síntesis a la escala de 0,2 µmol se pueden realizar en un sintetizador de placas de 96 pocillos de Protogene (Palo Alto, CA). Sin embargo, una escala mayor o menor de síntesis también está dentro del alcance de esta descripción. Los expertos en la técnica conocen reactivos adecuados para la síntesis de oligonucleótidos, métodos para la desprotección de ARN y métodos para la purificación de ARN.

Las moléculas de ARNip también se pueden sintetizar por una técnica de síntesis en tándem, en donde ambas cadenas se sintetizan como un único fragmento o cadena de oligonucleótido continuo separado por un conector escindible que posteriormente se escinde para proporcionar fragmentos o cadenas separados que hibridan para formar el dúplex de ARNip. El conector puede ser un conector polinucleotídico o un conector no nucleotídico. La síntesis en tándem del ARNip se puede adaptar fácilmente tanto a plataformas de síntesis multipocillo/multiplaca como a plataformas de síntesis a gran escala que usan reactores discontinuos, columnas de síntesis y similares. Alternativamente, las moléculas de ARNip se pueden ensamblar a partir de dos oligonucleótidos distintos, en donde un oligonucleótido comprende la cadena codificante y el otro comprende la cadena antiparalela del ARNip. Por ejemplo, se puede sintetizar cada cadena por separado y unir entre sí por hibridación o ligado después de la síntesis y/o desprotección. En ciertos otros casos, las moléculas de ARNip se pueden sintetizar como un único fragmento de

oligonucleótido continuo, donde las regiones codificante y antiparalela complementarias hibridan para formar un dúplex de ARNip que tiene una estructura secundaria de horquilla.

c) Modificación de secuencias de ARNip

5 En ciertos aspectos, las moléculas de ARNip comprenden un dúplex que tiene dos cadenas y al menos un nucleótido modificado en la región de doble cadena, en donde cada cadena es de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud. Ventajosamente, el ARNip modificado es menos inmunoestimulador que una secuencia de ARNip no modificada correspondiente, pero conserva la capacidad de silenciar la expresión de una secuencia diana. En realizaciones preferidas, el grado de modificaciones químicas introducidas en la molécula de ARNip logra un equilibrio entre la reducción o anulación de las propiedades inmunoestimuladoras del ARNip y la retención de la actividad de iARN. Como un ejemplo no limitante, una molécula de ARNip que se dirige a un gen de interés se puede modificar mínimamente (p. ej., menos de aproximadamente 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% modificado) en los nucleótidos uridina y/o guanosina selectivos dentro del dúplex de ARNip para eliminar la respuesta inmunitaria generada por el ARNip mientras que retiene su capacidad para silenciar la expresión del gen diana.

15 Los ejemplos de nucleótidos modificados adecuados para su uso en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a ribonucleótidos que tienen un 2'-O-metilo (2'OMe), 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), 2'-desoxi-, 5-C-metilo, 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), 4'-tio, 2'-amino o 2'-C-alilo. Los nucleótidos modificados que tienen una conformación Northern tales como los descritos, p. ej., en Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, Springer-Verlag Ed. (1984), también son adecuados para usar en moléculas de ARNip. Dichos nucleótidos modificados incluyen, sin limitación, nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA) (p. ej., nucleótidos 2'-O, 4'-C-metileno-(D-ribofuranosilo)), nucleótidos 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos 2'-metil-tio-etilo, nucleótidos 2'-desoxi-2'-fluoro (2'F), nucleótidos 2'-desoxi-2'-cloro (2'Cl) y nucleótidos 2'-azido. En ciertos casos, las moléculas de ARNip descritas en la presente memoria incluyen uno o más nucleótidos G-abrazadera. Un nucleótido G-abrazadera se refiere a un análogo de citosina modificado en donde las modificaciones confieren la capacidad de unir con enlaces de hidrógeno tanto las caras de Watson-Crick como de Hoogsteen de un nucleótido guanina complementario dentro de un dúplex (véase, por ejemplo, Lin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 120: 8531-8532 (1998)). Además, los nucleótidos que tienen un análogo de base nucleotídica como, por ejemplo, C-fenilo, C-naftilo, otros derivados aromáticos, inosina, azol carboxamidas y derivados de nitroazol tales como 3-nitropirrol, 4-nitroindol, 5-nitroindol y 6-nitroindol (véase, por ejemplo, Loakes, *Nucl. Acids Res.*, 29: 2437-2447 (2001)) se puede incorporar en las moléculas de ARNip.

30 En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNip pueden comprender además una o más modificaciones químicas tales como restos de casquete terminal, modificaciones de la cadena principal de fosfato y similares. Los ejemplos de restos de casquete terminales incluyen, sin limitación, restos abásicos desoxi invertidos, modificaciones de glicerilo, nucleótidos 4',5'-metileno, nucleótidos 1-( $\beta$ -D-eritrofuranosilo), nucleótidos 4'-tio, nucleótidos carbocíclicos, nucleótidos 1,5-anhidrohexitol, L-nucleótidos,  $\alpha$ -nucleótidos, nucleótidos de base modificada, nucleótidos de *treo*-pentofuranosilo, nucleótidos acíclicos 3',4'-seco, nucleótidos acíclicos 3,4-dihidroxibutilo, nucleótidos acíclicos 3,5-dihidroxipentilo, restos nucleótidos invertidos 3'-3', restos abásicos 3'-3'-invertidos restos de nucleótidos 3'-2'-invertidos, restos abásicos 3'-2'-invertidos, restos de nucleótidos 5'-5'-invertidos, restos abásicos 5'-5'-invertidos, restos abásicos desoxi 3'-5'-invertidos, 5'-aminoalquil-fosfato, 1,3-diamino-2-propil-fosfato, 3-aminopropil-fosfato, 6-aminohexil-fosfato, 1,2-aminododecil-fosfato, hidroxipropil-fosfato, 1,4-butanodiol-fosfato, 3'-fosforamidato, 5'-fosforamidato, hexilfosfato, aminohexil-fosfato, 3'-fosfato, 5'-amino, 3'-fosforotioato, 5'-fosforotioato, fosforoditioato y metilfosfonato con puente o sin puente o restos 5'-mercapto (véase, p. ej., patente de EE.UU. n° 5.998.203; Beaucage et al., *Tetrahedron* 49: 1925 (1993)). Ejemplos no limitantes de modificaciones de la cadena principal de fosfato (es decir, que dan enlaces internucleótidos modificados) incluyen fosforotioato, fosforoditioato, metilfosfonato, fosfotriéster, morfolino, amidato, carbamato, carboximetilo, acetamidato, poliamida, sulfonato, sulfonamida, sulfamato, formacetal, tioformacetal y sustituciones de alquilsililo (véase, p. ej., Hunziker et al., *Nucleic Acid Analogues: Synthesis and Properties, in Modern Synthetic Methods*, VCH, 331-417 (1995); Mesmaeker et al., *Novel Backbone Replacements for Oligonucleotides, in Carbohydrate Modifications in Antisense Research*, ACS, 24-39 (1994)). Dichas modificaciones químicas pueden ocurrir en el extremo 5' y/o el extremo 3' de la cadena codificante, la cadena antiparalela, o ambas cadenas del ARNip.

50 En algunas realizaciones, la cadena codificante y/o antiparalela de la molécula de ARNip puede comprender además un extremo saliente 3' que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 (p. ej., 1, 2, 3, o 4) 2'-desoxi-ribonucleótidos, modificados (p. ej., 2'OMe) y/o ribonucleótidos uridina no modificados, y/o cualquier otra combinación de nucleótidos modificados (p. ej., 2'OMe) y no modificados.

55 Se describen ejemplos adicionales de nucleótidos modificados y tipos de modificaciones químicas que se pueden introducir en las moléculas de ARNip, p. ej., en la patente del Reino Unido n° GB 2.397.818 B y publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0192626, 2005/0282188 y 2007/0135372.

60 Las moléculas de ARNip descritas en la presente memoria pueden comprender opcionalmente uno o más nucleótidos en una o ambas cadenas del ARNip. Como se usa en la presente memoria, el término "no nucleótido" se refiere a cualquier grupo o compuesto que se pueda incorporar en una cadena de ácido nucleico en lugar de una o más unidades de nucleótidos, incluyendo sustituciones de azúcar y/o fosfato, y permita que las bases restantes

presenten su actividad. El grupo o compuesto es básico en cuanto que no contiene una base de nucleótido comúnmente reconocida como adenosina, guanina, citosina, uracilo o timina y, por lo tanto, carece de una base en la posición 1'.

5 En otras realizaciones, la modificación química del ARNip comprende unir un conjugado a la molécula de ARNip. El  
 10 conjugado se puede unir en el extremo 5' y/o 3' de la cadena codificante y/o antiparalela del ARNip por una unión  
 covalente tal como, p. ej., un conector biodegradable. El conjugado también se puede unir al ARNip, p. ej., por un  
 grupo carbamato u otro grupo conector (véase, p. ej., publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n°  
 2005/0074771, 2005/0043219 y 2005/0158727). En ciertos casos, el conjugado es una molécula que facilita el  
 suministro del ARNip en una célula. Los ejemplos de moléculas de conjugado adecuadas para la unión a ARNip  
 15 incluyen, pero no se limitan a esteroides tales como colesterol, glicoles tales como polietilenglicol (PEG), albúmina  
 de suero humano (HSA), ácidos grasos, carotenoides, terpenos, ácidos biliares, folatos (p. ej., ácido fólico, análogos  
 de folato y sus derivados), azúcares (p. ej., galactosa, galactosamina, N-acetil galactosamina, glucosa, manosa,  
 fructosa, fucosa, etc.), fosfolípidos, péptidos, ligandos para receptores celulares capaces de mediar la captación  
 celular, y combinaciones de estos (véase, p. ej., publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0130186,  
 2004/0110296 y 2004/0249178; patente de EE.UU. n° 6.753.423). Otros ejemplos incluyen moléculas de conjugado  
 de resto lipófilo, vitamina, polímero, péptido, proteína, ácido nucleico, molécula pequeña, oligosacárido, grupo de  
 20 carbohidratos, intercalador, ligante del surco menor, agente de escisión y agente de reticulación, descritas en las  
 publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0119470 y 2005/0107325. Otros ejemplos más incluyen  
 moléculas conjugadas con la 2'-O-alkil amina, 2'-O-alcóxialquilamina, poliamina, pirimidina modificada catiónica en  
 C5, péptido catiónico, grupo guanidinio, grupo amidinino, aminoácidos catiónicos descritas en la publicación de  
 solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0153337. Los ejemplos adicionales incluyen moléculas de conjugado de  
 grupo hidrófobo, compuesto activo de membrana, compuesto que penetra en la célula, señal de direccionamiento  
 celular, modificador de interacción y estabilizador estérico, descritas en la publicación de solicitud de patente de  
 25 EE.UU. n° 2004/0167090. Otros ejemplos incluyen las moléculas de conjugado descritas en la publicación de  
 solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0239739. El tipo de conjugado usado y la extensión de la conjugación con la  
 molécula de ARNip se pueden evaluar para mejorar los perfiles farmacocinéticos, biodisponibilidad y/o la estabilidad  
 del ARNip mientras retienen la actividad de iARN. Como tal, un experto en la técnica puede examinar moléculas de  
 ARNip que tienen varios conjugados unidos a las mismas para identificar los que tienen propiedades mejoradas y  
 una actividad completa de iARN usando cualquiera de una variedad de modelos de cultivo celular in vitro o animales  
 30 in vivo bien conocidos.

#### d) Genes diana

El componente de ARNip de las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria se puede usar  
 para regular por disminución o silenciar la traducción (es decir, expresión) de un gen de interés. Los genes de  
 35 interés incluyen, pero no se limitan a genes asociados con la infección y supervivencia vírica, genes asociados con  
 enfermedades y trastornos metabólicos (p. ej., enfermedades y trastornos hepáticos), genes asociados a  
 oncogénesis o transformación celular (p. ej., cáncer), genes angiogénicos, genes inmunomoduladores tales como  
 los asociados con respuestas inflamatorias y autoinmunitarias, genes de ligandos de receptores y genes asociados  
 con trastornos neurodegenerativos.

40 En realizaciones particulares, se describe en la presente memoria un cóctel de dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete,  
 ocho, nueve, diez o más moléculas de ARNip que silencian la expresión de múltiples genes de interés. En algunas  
 realizaciones, el cóctel de moléculas de ARNip está completamente encapsulado en una partícula lipídica tal como  
 una partícula de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP). Las moléculas de ARNip se pueden encapsular conjuntamente  
 en la misma partícula lipídica, o se puede formular cada especie de ARNip presente en el cóctel en partículas  
 separadas.

45 Los genes asociados con la infección y la supervivencia vírica incluyen los expresados por un hospedante (p. ej., un  
 factor de hospedante tal como el factor tisular (TF)) o un virus con el fin de unirse, incorporarse y replicarse en una  
 célula. Son de particular interés las secuencias víricas asociadas con enfermedades víricas crónicas. Las  
 secuencias víricas de particular interés incluyen secuencias de filovirus como el virus del ébola y el virus de Marburg  
 (véase, por ejemplo, Geisbert et al., *J. Infect. Dis.*, 193: 1650-1657 (2006)); arenavirus tales como el virus Lassa,  
 50 virus Junin, virus Machupo, virus Guanarito y virus Sabia (Buchmeier et al., *Arenaviridae: the viruses and their  
 replication*, En: *FIELDS VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4ª ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, (2001)); virus de la  
 gripe tales como virus de la gripe A, B y C, (véase p. ej., Steinhauer et al., *Annu Rev Genet.*, 36:305-332 (2002); y  
 Neumann et al., *J Gen Virol.*, 83:2635-2662 (2002)); virus de la hepatitis (véase p. ej., Hamasaki et al., *FEBS Lett.*,  
 543:51 (2003); Yokota et al., *EMBO Rep.*, 4:602 (2003); Schlomai et al., *Hepatology*, 37:764 (2003); Wilson et al.,  
 55 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2783 (2003); Kapadia et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:2014 (2003); y *FIELDS  
 VIROLOGY*, Knipe et al. (eds.), 4ª ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (2001)); virus de inmunodeficiencia humana  
 (HIV) (Banerjee et al., *Mol. Ther.*, 8:62 (2003); Song et al., *J. Virol.*, 77:7174 (2003); Stephenson, *JAMA*, 289:1494  
 (2003); Qin et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:183 (2003)); virus del herpes (Jia et al., *J. Virol.*, 77:3301 (2003));  
 y virus del papiloma humano (HPV) (Hall et al., *J. Virol.*, 77:6066 (2003); Jiang et al., *Oncogene*, 21:6041 (2002)).

60 Las secuencias de ácido nucleico de filovirus de ejemplo que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a  
 secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (p. ej., VP30, VP35, nucleoproteína (NP),



proteína polimerasa (L-pol)) y proteínas asociadas a membrana (p. ej., VP40, glicoproteína (GP), VP24). Las secuencias genómicas completas para el virus del ébola se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_002549; AY769362; NC\_006432; NC\_004161; AY729654; AY354458; AY142960; AB050936; AF522874; AF499101; AF272001; y AF086833. Las secuencias del virus del ébola VP24 se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso U77385 y AY058897. Las secuencias del virus del ébola L-pol se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso X67110. Las secuencias del virus del ébola VP40 se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso AY058896. Las secuencias del virus del ébola NP se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso AY058898; Sanchez et al., *Virus Res.*, 29:215-240 (1993); Will et al., *J. Virol.*, 67:1203-1210 (1993); Volchkov et al., *FEBS Lett.*, 305:181-184 (1992); y patente de EE.UU. nº 6.713.069. Se exponen secuencias adicionales del virus del ébola, p. ej., en Genbank con nº de acceso L11365 y X61274. Las secuencias del genoma completo para el virus de Marburg se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_001608; AY430365; AY430366; y AY358025. Las secuencias del virus de Marburg GP se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso AF005734; AF005733; y AF005732. Las secuencias del virus de Marburg VP35 se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso AF005731 y AF005730. Se exponen secuencias adicionales del virus de Marburg, p. ej., en Genbank con nº de acceso X64406; Z29337; AF005735; y Z12132. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a secuencias de ácido nucleico del virus del ébola y del virus de Marburg incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0135370 y solicitud provisional de EE.UU. nº 61/286.741, presentada el 15 de diciembre de 2009.

Las secuencias de ácido nucleico de Arenavirus de ejemplo que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácido nucleico que codifican nucleoproteína (NP), glicoproteína (GP), L-polimerasa (L) y proteína Z (Z). Las secuencias completas de genoma para el virus de Lassa se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_004296 (segmento S de LASV) y NC\_004297 (segmento L de LASV). Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a las secuencias de ácido nucleico del virus Lassa incluyen las descritas en la solicitud provisional de EE.UU. nº 61/319.855, presentada el 31 de marzo de 2010.

Las secuencias de ácidos nucleicos de hospedante de ejemplo que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácidos nucleicos que codifican factores del hospedante tales como el factor tisular (FT), que se sabe que tienen una función en la patogenia de los virus de la fiebre hemorrágica. La secuencia de ARNm del TF se expone en Genbank con el número de acceso de NM\_001993. Los expertos en la técnica apreciarán que el TF también se conoce como F3, factor de coagulación III, tromboplastina y CD142. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a las secuencias de ácido nucleico de ITF incluyen las descritas en solicitud provisional de EE.UU. nº 61/319.855, presentada el 31 de marzo de 2010.

Las secuencias de ejemplo de ácido nucleico del virus de la gripe que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a secuencias de ácido nucleico que codifican nucleoproteína (NP), proteínas de la matriz (M1 y M2), proteínas no estructurales (NS1 y NS2), ARN polimerasa (PA, PB1, PB2), neuraminidasa (NA) y hemaglutinina (HA). Las secuencias de NP de influenza A se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_004522; AY818138; AB166863; AB188817; AB189046; AB189054; AB189062; AY646169; AY646177; AY651486; AY651493; AY651494; AY651495; AY651496; AY651497; AY651498; AY651499; AY651500; AY651501; AY651502; AY651503; AY651504; AY651505; AY651506; AY651507; AY651509; AY651528; AY770996; AY790308; AY818138; y AY818140. Las secuencias de PA de influenza A se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso AY818132; AY790280; AY646171; AY818132; AY818133; AY646179; AY818134; AY551934; AY651613; AY651610; AY651620; AY651617; AY651600; AY651611; AY651606; AY651618; AY651608; AY651607; AY651605; AY651609; AY651615; AY651616; AY651640; AY651614; AY651612; AY651621; AY651619; AY770995; y AY724786. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a las secuencias de ácido nucleico del virus de la gripe incluyen las descritas en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0218122.

Las secuencias de ácido nucleico de ejemplo del virus de la hepatitis que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a las secuencias de ácido nucleico implicadas en la transcripción y traducción (p. ej., En1, En2, X, P) y secuencias de ácido nucleico que codifican proteínas estructurales (p. ej., proteínas del núcleo, que incluyen las proteínas C y relacionadas con C, proteínas de la cápside y la envoltura, incluyendo las proteínas S, M y/o L, o sus fragmentos) (véase, por ejemplo, FIELDS VIROLOGY, véase antes). Las secuencias de ácido nucleico de ejemplo del virus de la hepatitis C (VHC) que se pueden silenciar incluyen, pero no se limitan a la región 5' no traducida (5'-UTR), la región 3' no traducida (3'-UTR), región codón de inicio de la traducción de poliproteína, la secuencia de sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y/o secuencias de ácido nucleico que codifican la proteína central, la proteína E1, la proteína E2, la proteína p7, la proteína NS2, la proteasa/helicasa NS3, la proteína NS4A, la proteína NS4B, la proteína NS5A y/o la ARN polimerasa dependiente de ARN NS5B. Las secuencias de genoma del VHC se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_004102 (genotipo de VHC 1a), AJ238799 (genotipo de VHC 1b), NC\_009823 (genotipo de VHC 2), NC\_009824 (genotipo de VHC 3), NC\_009825 (genotipo de VHC 4), NC\_009826 (genotipo de VHC 5), y NC\_0098242 (genotipo de VHC 6). Las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis A se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_001489; las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis B se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_003977; las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis D se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_001653; las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis E se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_001434; y las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis G se exponen, p. ej., en Genbank con nº de acceso NC\_001710. El silenciamiento

de secuencias que codifican genes asociados con la infección y la supervivencia vírica se puede usar convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar la afección vírica. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a las secuencias de ácido nucleico del virus de la hepatitis incluyen las descritas en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2006/0281175, 2005/0058982 y 2007/0149470; patente de EE.UU. n° 7.348.314; y la solicitud PCT n° PCT/CA2010/000444, titulada "Composiciones y métodos para silenciar la expresión del virus de la hepatitis C", presentada el 19 de marzo de 2010, con el número de expediente del apoderado 020801-008910PC.

Los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (p. ej., trastornos en los que el hígado es el diana y las enfermedades y trastornos hepáticos) incluyen, pero no se limitan a genes expresados en dislipidemia, tales como p. ej., apolipoproteína B (APOB) (Genbank con n° de acceso NM\_000384), apolipoproteína CIII (APOC3) (Genbank con n° de acceso NM\_000040 y NG\_008949 REGION: 5001..8612), apolipoproteína E (APOE) (Genbank con n° de acceso NM\_000041 y NG\_007084 REGION: 5001..8612), proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9) (Genbank con n° de acceso NM\_174936), diacilglicerol O-aciltransferasa tipo 1 (DGAT1) (Genbank con n° de acceso NM\_012079), diacilglicerol O-aciltransferasa tipo 2 (DGAT2) (Genbank con n° de acceso NM\_032564), receptores X del hígado tales como LXR $\alpha$  y LXR $\beta$  (Genbank con n° de acceso NM\_007121), receptores X farnesoides (FXR) (Genbank con n° de acceso NM\_005123), proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP), proteasa de sitio 1 (S1P), 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima-A reductasa (HMG coenzima-A reductasa); y genes expresados en la diabetes, tales como, p. ej., glucosa 6-fosfatasa (véase p. ej., Forman et al., *Cell*, 81:687 (1995); Seol et al., *Mol. Endocrinol.*, 9:72 (1995); Zavacki et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7909 (1997); Sakai et al., *Cell*, 85:1037-1046 (1996); Duncan et al., *J. Biol. Chem.*, 272:12778-12785 (1997); Willy et al., *Genes Dev.*, 9:1033-1045 (1995); Lehmann et al., *J. Biol. Chem.*, 272:3137-3140 (1997); Janowski et al., *Nature*, 383:728-731 (1996); y Peet et al., *Cell*, 93:693-704 (1998)).

Un experto en la técnica apreciará que los genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos (p. ej., enfermedades y trastornos en los que el hígado es un diana y enfermedades y trastornos del hígado) incluyen genes que se expresan en el propio hígado, así como genes expresados en otros órganos y tejidos. El silenciamiento de secuencias que codifican genes asociados con enfermedades y trastornos metabólicos se puede usar convenientemente en combinación con la administración de agentes convencionales usados para tratar la enfermedad o trastorno. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen APOB incluyen los descritos en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2006/0134189, 2006/0105976 y 2007/0135372 y publicación PCT n° WO 04/091515. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen APOC3 incluyen los descritos en la solicitud PCT n° PCT/CA2010/000120, presentada el 26 de enero de 2010. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen PCSK9 incluyen los descritos en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2007/0173473, 2008/0113930 y 2008/0306015. Las moléculas de ARNip de ejemplo que se dirigen al gen DGAT1 se pueden diseñar usando los compuestos antisentido descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2004/0185559. Las moléculas de ARNip de ejemplo que se dirigen al gen DGAT2 se pueden diseñar usando los compuestos antisentido descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0043524.

Los genes asociados a oncogénesis o transformación celular (p. ej., cáncer u otra neoplasia) incluyen, por ejemplo, genes implicados en la ubiquitinación de p53, ubiquitinación de c-Jun, desacetilación de histonas, regulación del ciclo celular, regulación de la transcripción y combinaciones de estos. Los ejemplos no limitantes de secuencias de genes asociadas con la oncogénesis o la transformación celular incluyen serina/treonina quinazas, como la quinasa tipo polo 1 (PLK-1) (Genbank con n° de acceso NM\_005030; Barr et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 5: 429-440 (2004)) y quinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4) (Genbank con n° de acceso NM\_000075); ubiquitina ligasas tales como COP1 (RFWD2; Genbank con n° de acceso NM\_022457 y NM\_001001740) y anillo-caja 1 (RBX1) (ROC1; Genbank con n° de acceso NM\_014248); tirosina quinazas tales como WEE1 (Genbank con n° de acceso NM\_003390 y NM\_001143976); quinesinas mitóticas, tales como Eg5 (KSP, KIF11; Genbank con n° de acceso NM\_004523); factores de transcripción tales como forkhead box M1 (FOXO1) (Genbank con n° de acceso NM\_202002, NM\_021953 y NM\_202003) y RAM2 (R1 o CDCA7L; Genbank con n° de acceso NM\_018719, NM\_001127370 y NM\_001127371); inhibidores de la apoptosis tales como XIAP (Genbank con n° de acceso NM\_001167); subunidades del señalosoma COP9 tales como CSN1, CSN2, CSN3, CSN4, CSN5 (JAB1; Genbank con n° de acceso NM\_006837); CSN6, CSN7A, CSN7B y CSN8; y las histonas desacetilasas, como HDAC1, HDAC2 (Genbank con n° de acceso NM\_001527), HDAC3, HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8, HDAC9, etc.

Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen PLK-1 incluyen los descritos en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0107316 y 2007/0265438; y publicación PCT n° WO 09/082817. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a los genes Eg5 y XIAP incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2009/0149403. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen CSN5 incluyen los descritos en la publicación PCT n° WO 09/129319. Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen a los genes COP1, CSN5, RBX1, HDAC2, CDK4, WEE1, FOXO1 y RAM2 incluyen los descritos en solicitud provisional de EE.UU. n° 61/245.143, presentada el 23 de septiembre de 2009.

Los ejemplos adicionales de secuencias de genes asociadas con la oncogénesis o la transformación celular incluyen secuencias de translocación tales como los genes de fusión MLL, BCR-ABL (Wilda et al., *Oncogene*, 21: 5716

(2002); Scherr et al., *Blood*, 101: 1566 (2003)), TEL-AML1, EWS-FLI1, TLS-FUS, PAX3-FKHR, BCL-2, AML1-ETO y AML1-MTG8 (Heidenreich et al., *Blood*, 101: 3157 (2003)); secuencias sobreexpresadas, como los genes de multirresistencia a fármacos (Nieth y otros, *FEBS Lett.*, 545: 144 (2003); Wu et al, *Cancer Res.* 63: 1515 (2003)), ciclinas (Li et al., *Cancer Res.*, 63: 3593 (2003); Zou et al., *Genes Dev.*, 16: 2923 (2002)), beta-catenina (Verma et al., *Clin Cancer Res.*, 9: 1291 (2003).)), genes de telomerasa (Kosciolek et al., *Mol Cancer Ther.*, 2: 209 (2003)), c-MYC, N-MYC, BCL-2, receptores del factor de crecimiento (p. ej., EGFR/ErbB1 (Genbank con nº de acceso NM\_005228, NM\_201282, NM\_201283 y NM\_201284; véase también, Nagy et al. *Exp. Cell Res.*, 285: 39-49 (2003)), ErbB2/HER-2 (Genbank con nº de acceso NM\_004448 y NM\_001005862), ErbB3 (Genbank con nº de acceso NM\_001982 y NM\_001005915) y ErbB4 (Genbank con nº de acceso NM\_005235 y NM\_001042599) y secuencias mutadas como las RAS (Tuschl y Borkhardt, *Mol. Intervenciones*, 2: 158 (2002)). Los ejemplos no limitantes de moléculas de ARNip que se dirigen al gen EGFR incluyen los descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2009/0149403. Las moléculas de ARNip que se dirigen a los genes VEGFR se exponen, p. ej., en documento GB 2396864; publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2004/0142895; y CA 2456444.

El silenciamiento de secuencias que codifican enzimas reparadoras de ADN encuentra uso en combinación con la administración de agentes quimioterapéuticos (Collis et al., *Cancer Res.*, 63: 1550 (2003)). Los genes que codifican proteínas asociadas con la migración tumoral también son secuencias diana de interés, por ejemplo, integrinas, selectinas y metaloproteinasas. Los ejemplos anteriores no son exclusivos. Los expertos en la materia entenderán que cualquier secuencia génica parcial o completa que facilite o promueva la oncogénesis o la transformación celular, el crecimiento tumoral o la migración tumoral se pueden incluirse como una secuencia molde.

Los genes angiogénicos son capaces de promover la formación de nuevos vasos. Los genes angiogénicos de particular interés incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (Reich et al., *Mol. Vis.*, 9: 210 (2003)), factor de crecimiento placentario (PGF), VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR/Flk-1), y similares. Las moléculas de ARNip que se dirigen a los genes VEGFR se exponen, p. ej., en el documento GB 2396864; publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2004/0142895; y CA 2456444.

Los genes inmunomoduladores son genes que modulan una o más respuestas inmunitarias. Los ejemplos de genes inmunomoduladores incluyen, sin limitación, factores de crecimiento (p. ej., TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , EGF, FGF, IGF, NGF, PDGF, CGF, GM-CSF, SCF, etc.), interleuquinas (p. ej., IL-2, IL-4, IL-12 (Hill et al., *J. Immunol.*, 171: 691 (2003)), IL-15, IL-18, IL-20, etc.), interferones (p. ej., IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , etc.), y TNF. Los genes de Fas y ligando Fas también son secuencias diana inmunomoduladoras de interés (Song et al., *Nat. Med.*, 9: 347 (2003)). Los genes que codifican moléculas de señalización secundarias en células hematopoyéticas y linfoides también se incluyen en la presente descripción, por ejemplo, quinasas de la familia Tec como la tirosina quinasa de Bruton (Btk) (Heinonen et al., *FEBS Lett.*, 527: 274 (2002)).

Los genes de ligandos de receptores celulares incluyen ligandos que se pueden unir a los receptores de la superficie celular (p. ej., receptores de citoquinas, receptores de factor de crecimiento, receptores con actividad de tirosina quinasa, receptores acoplados a proteína G, receptor de insulina, receptor de EPO, etc.) para modular (p. ej., inhibir) la ruta fisiológica en la que está implicada el receptor (p. ej., proliferación celular, oncogénesis, transformación celular, mitogénesis, etc.). Los ejemplos no limitantes de genes de ligandos de receptores celulares incluyen citoquinas (p. ej., TNF- $\alpha$ , interferones tales como IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , interleuquinas tales como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, IL-23, IL-27, quimioquinas, etc.), factores de crecimiento (p. ej., EGF, HB-EGF, VEGF, PEDF, SDGF, bFGF, HGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , BMP1-BMP15, PDGF, IGF, NGF,  $\beta$ -NGF, BDNF, NT3, NT4, GDF-9, CGF, G-CSF, GM-CSF, GDF-8, EPO, TPO, etc.), insulina, glucagón, ligandos de receptores acoplados a proteína G, etc.

Los moldes que codifican una expansión de repeticiones de trinucleótidos (p. ej., repeticiones CAG) encuentran uso en el silenciamiento de secuencias patógenas en trastornos neurodegenerativos causados por la expansión de repeticiones de trinucleótidos, como la atrofia muscular espinobulbar y la enfermedad de Huntington (Caplen et al., *Hum. Mol. Genet.*, 11: 175 (2002)).

Además de su utilidad para silenciar la expresión de cualquiera de los genes descritos antes con fines terapéuticos, el ARNip descrito en la presente memoria también es útil en aplicaciones de investigación y desarrollo, así como en aplicaciones de diagnóstico, profilácticas, de pronóstico, clínicas y otras aplicaciones sanitarias. Como un ejemplo no limitante, el ARNip se puede usar en estudios de validación de dianas dirigidos a ensayar si un gen de interés tiene el potencial de ser una diana terapéutica. El ARNip también se puede usar en estudios de identificación de dianas dirigidos a descubrir genes como potenciales dianas terapéuticos.

#### e) Realizaciones de ARNip de ejemplo

En algunas realizaciones, cada cadena de la molécula ARNip comprende de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (p. ej., aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, o 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 nucleótidos de longitud). En una realización particular, el ARNip se sintetiza químicamente. Las moléculas de ARNip descritas en la presente memoria pueden silenciar la expresión de una secuencia diana in vitro y/o in vivo.

En otras realizaciones, el ARNip comprende al menos un nucleótido modificado. En ciertas realizaciones, el ARNip comprende uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más nucleótidos modificados en la región de doble cadena. En realizaciones particulares, menos de aproximadamente 50% (p. ej., menos de aproximadamente 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5% de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprenden nucleótidos modificados. En realizaciones preferidas, de aproximadamente 1% a aproximadamente 50% (p. ej., de aproximadamente 5%-50%, 10%-50%, 15%-50%, 20%-50%, 25%-50%, 30%-50%, 35%-50%, 40%-50%, 45%-50%, 5%-45%, 10%-45%, 15%-45%, 20%-45%, 25%-45%, 30%-45%, 35%-45%, 40%-45%, 5%-40%, 10%-40%, 15%-40%, 20%-40%, 25%-40%, 30%-40%, 35%-40%, 5%-35%, 10%-35%, 15%-35%, 20%-35%, 25%-35%, 30%-35%, 5%-30%, 10%-30%, 15%-30%, 20%-30%, 25%-30%, 5%-25%, 10%-25%, 15%-25%, 20%-25%, 5%-20%, 10%-20%, 15%-20%, 5%-15%, 10%-15% o 5%-10%) de los nucleótidos en la región de doble cadena del ARNip comprenden nucleótidos modificados.

En realizaciones adicionales, el ARNip comprende nucleótidos modificados que incluyen, pero no se limitan a nucleótidos 2'-O-metilo (2'OMe), nucleótidos 2'-desoxi-2'-flúor (2'F), nucleótidos 2'-desoxi, nucleótidos 2'-O-(2-metoxietilo) (MOE), nucleótidos de ácido nucleico bloqueado (LNA), y sus mezclas. En realizaciones preferidas, el ARNip comprende nucleótidos 2'OMe (p. ej., nucleótidos 2'OMe-purina y/o pirimidina) tales como, p. ej., nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, nucleótidos 2'OMe-adenosina, nucleótidos 2'OMe-citosina, o sus mezclas. En una realización particular, el ARNip comprende al menos un nucleótido 2'OMe-guanosina, nucleótido 2'OMe-uridina, o sus mezclas. En ciertos casos, el ARNip no comprende nucleótidos 2'OMe-citosina. En otras realizaciones, el ARNip comprende una estructura de bucle de horquilla.

En ciertas realizaciones, el ARNip comprende nucleótidos modificados en una cadena (es decir, codificante o antiparalela) o ambas cadenas de la región de doble cadena de la molécula ARNip. Preferiblemente, los nucleótidos uridina y/o guanosina se modifican en posiciones selectivas en la región de doble cadena del dúplex de ARNip. Con respecto a las modificaciones del nucleótido uridina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los nucleótidos uridina en la cadena codificante y/o antiparalela pueden ser un nucleótido uridina modificado tal como un nucleótido 2'OMe-uridina. En algunas realizaciones, cada nucleótido uridina en la cadena codificante y/o antiparalela es un nucleótido 2'OMe-uridina. Con respecto a las modificaciones del nucleótido guanosina, al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o más de los nucleótidos guanosina en la cadena codificante y/o antiparalela puede ser un nucleótido guanosina modificado tal como un nucleótido 2'OMe-guanosina. En algunas realizaciones, cada nucleótido guanosina en la cadena codificante y/o antiparalela es un nucleótido 2'OMe-guanosina.

En ciertas realizaciones, se pueden modificar al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más motivos 5'-GU-3' en una secuencia de ARNip, p. ej., introduciendo emparejamientos erróneos para eliminar los motivos 5'-GU-3' y/o introduciendo nucleótidos modificados tales como nucleótidos 2'OMe. El motivo 5'-GU-3' puede estar en la cadena codificante, la cadena antiparalela, o ambas cadenas de la secuencia de ARNip. Los motivos 5'-GU-3' pueden estar adyacentes entre sí o, alternativamente, pueden estar separados por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más nucleótidos.

En algunas realizaciones, una molécula de ARNip modificada es menos inmunoestimuladora que una secuencia de ARNip no modificada correspondiente. En dichas realizaciones, la molécula de ARNip modificada con propiedades inmunoestimulantes reducidas retiene ventajosamente la actividad de iARN contra la secuencia diana. En otra realización, las propiedades inmunoestimuladoras de la molécula de ARNip modificada y su capacidad para silenciar la expresión del gen diana se pueden equilibrar u optimizar mediante la introducción de modificaciones de 2'OMe mínimas y selectivas dentro de la secuencia del ARNip, tal como, p. ej., dentro de la región de doble cadena del dúplex de ARNip. En ciertos casos, el ARNip modificado es al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% menos inmunoestimulador que el correspondiente ARNip no modificado. Será fácilmente evidente para los expertos en la materia que las propiedades inmunoestimulantes de la molécula de ARNip modificada y la correspondiente molécula de ARNip no modificada se pueden determinar, por ejemplo, midiendo los niveles de INF- $\alpha$  y/o IL-6 desde aproximadamente dos a aproximadamente doce horas después de la administración sistémica a un mamífero o la transfección de una célula respondedora de mamífero usando un sistema de suministro basado en lípidos adecuado (tal como el sistema de suministro de LNP descrito en la presente memoria).

En otras realizaciones, una molécula de ARNip modificada tiene una  $CI_{50}$  (es decir, concentración inhibitoria semimáxima) menor o igual que diez veces la de los correspondientes ARNip no modificados (es decir, el ARNip modificado tiene una  $CI_{50}$  que es menor o igual que diez veces la  $CI_{50}$  del correspondiente ARNip no modificado). En otras realizaciones, el ARNip modificado tiene una  $CI_{50}$  menor o igual que tres veces el de la correspondiente secuencia de ARNip no modificada. En otras realizaciones más, el ARNip modificado tiene una  $CI_{50}$  menor o igual que dos veces la del correspondiente ARNip no modificado. Será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que se puede generar una curva de dosis-respuesta y los valores de  $CI_{50}$  para el ARNip modificado y el correspondiente ARNip no modificado se pueden determinar fácilmente usando métodos conocidos por los expertos en la técnica.

En otra realización, una molécula de ARNip no modificada o modificada es capaz de silenciar al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99% o 100% de la expresión de la secuencia diana con respecto a un control negativo (p. ej., tampón solo, una secuencia de ARNip que se dirige a un gen diferente, una secuencia de ARNip desordenada, etc.).

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

10 En algunas realizaciones, la molécula de ARNip no comprende modificaciones de la cadena principal de fosfato, p. ej., en la cadena codificante y/o antiparalela de la región de doble cadena. En otras realizaciones, el ARNip comprende una, dos, tres, cuatro o más modificaciones de la cadena principal de fosfato, p. ej., en la cadena codificante y/o antiparalela de la región de doble cadena. En realizaciones preferidas, el ARNip no comprende modificaciones de la cadena principal de fosfato.

15 En realizaciones adicionales, el ARNip no comprende nucleótidos 2'-desoxi, p. ej., en la cadena codificante y/o antiparalela de la región de doble cadena. En otras realizaciones adicionales, el ARNip comprende uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos 2'-desoxi, p. ej., en la cadena codificante y/o antiparalela de la región de doble cadena. En realizaciones preferidas, el ARNip no comprende nucleótidos 2'-desoxi.

En ciertos casos, el nucleótido en el extremo 3' de la región de doble cadena en la cadena codificante y/o antiparalela no es un nucleótido modificado. En algunos otros casos, los nucleótidos cerca del extremo 3' (p. ej., en el espacio de uno, dos, tres o cuatro nucleótidos del extremo 3') de la región de doble cadena en la cadena codificante y/o antiparalela no son nucleótidos modificados.

20 Las moléculas de ARNip descritas en la presente memoria pueden tener extremos salientes 3' de uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos en uno o ambos lados de la región de doble cadena, o pueden carecer de extremos salientes (es decir, tienen extremos romos) en uno o ambos lados de la región de doble cadena. En ciertas realizaciones, el extremo saliente 3' en la cadena codificante y/o antiparalela comprende independientemente uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos modificados, tales como nucleótidos 2'OMe y/o cualquier otro nucleótido modificado descrito en la presente memoria o conocido en la técnica.

25 En realizaciones particulares, los ARNip se administran usando un sistema portador tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNip; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales; y (c) un lípido no catiónico (p. ej., DPPC, DSPC, DSPE y/o colesterol). En ciertos casos, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender además un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (p. ej., PEG-DAA y/o POZ-DAA).

## 30 2. ARNbc sustrato de Dicer

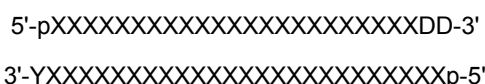
Como se usa en la presente memoria, la expresión "ARNbc sustrato de Dicer" o "molécula de iARN precursora" pretende incluir cualquier molécula precursora que sea procesada in vivo por Dicer para producir un ARNip activo que se incorpora al complejo RISC para la interferencia de ARN de un gen diana.

35 En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene una longitud suficiente para que sea procesado por Dicer para producir un ARNip. De acuerdo con esta realización, el ARNbc sustrato de Dicer comprende (i) una primera secuencia de oligonucleótido (también denominada cadena codificante) que tiene entre aproximadamente 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35 o 25-30 nucleótidos de longitud (p. ej., aproximadamente 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35 o 25-30 nucleótidos de longitud), preferiblemente entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud (p. ej., 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud), y (ii) una segunda secuencia de oligonucleótido (también denominada cadena antiparalela) que se asocia con la primera secuencia en condiciones biológicas, tales como las condiciones encontradas en el citoplasma de una célula. La segunda secuencia de oligonucleótido puede tener entre aproximadamente 25 y aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (p. ej., aproximadamente 25-60, 25-55, 25-50, 25-45, 25-40, 25-35 o 25-30 nucleótidos de longitud), y preferiblemente tiene entre aproximadamente 25 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud (p. ej., 25, 26, 27, 28, 29, o 30 nucleótidos de longitud). Además, una región de una de las secuencias, en particular de la cadena antiparalela, del ARNbc sustrato de Dicer tiene una longitud de secuencia de al menos aproximadamente 19 nucleótidos, por ejemplo, de aproximadamente 19 a aproximadamente 60 nucleótidos (p. ej., aproximadamente 19-60, 19-55, 19-50, 19-45, 19-40, 19-35, 19-30 o 19-25 nucleótidos), preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos (p. ej., 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos) que son suficientemente complementarios de una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana para producir una respuesta de iARN.

55 En una segunda realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene varias propiedades que mejoran su procesamiento por Dicer. De acuerdo con esta realización, el ARNbc tiene una longitud suficiente para que sea procesado por Dicer para producir un ARNip y tiene al menos una de las siguientes propiedades: (i) el ARNbc es asimétrico, p. ej., tiene un extremo saliente 3' en la cadena antiparalela; y/o (ii) el ARNbc tiene un extremo 3' modificado en la cadena codificante para dirigir la orientación de la unión de Dicer y el procesamiento del ARNbc a un ARNip activo. De acuerdo con esta última realización, la cadena codificante comprende de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos y la cadena antiparalela comprende de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos.

En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene un extremo saliente en el extremo 3' de la cadena antiparalela. En otra realización, la cadena codificante se modifica para la unión de Dicer y procesamiento mediante modificadores adecuados situados en el extremo 3' de la cadena codificante. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, aciclonucleótidos y similares, y moléculas estéricamente impedidas tales como moléculas fluorescentes y similares. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, reemplazan a los ribonucleótidos en el ARNbc de modo que la longitud del ARNbc no cambia. En otra realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene un extremo saliente en el extremo 3' de la cadena antiparalela y la cadena codificante se modifica para el procesamiento por Dicer. En otra realización, el extremo 5' de la cadena codificante tiene un fosfato. En otra realización, el extremo 5' de la cadena antiparalela tiene un fosfato. En otra realización, la cadena antiparalela o la cadena codificante o ambas cadenas tienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-O-metilo (2'OMe). En otra realización, la cadena antiparalela contiene nucleótidos 2'OMe modificados. En otra realización, la cadena antiparalela contiene un extremo saliente 3' que está compuesto por nucleótidos modificados con 2'OMe. La cadena antiparalela también podría incluir nucleótidos modificados con 2'OMe adicionales. Las cadenas codificante y antiparalela se reasocian en condiciones biológicas, tales como las condiciones que se encuentran en el citoplasma de una célula. Además, una región de una de las secuencias, en particular de la cadena antiparalela, del ARNbc sustrato de Dicer tiene una longitud de secuencia de al menos aproximadamente 19 nucleótidos, en donde estos nucleótidos están en la región de 21 nucleótidos adyacente al extremo 3' de la cadena antiparalela y son suficientemente complementarios de una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana. Además, de acuerdo con esta realización, el ARNbc sustrato de Dicer también puede tener una o más de las siguientes propiedades adicionales: (a) la cadena antiparalela tiene un desplazamiento hacia la derecha del típico oligómero de 21 unidades (es decir, la cadena antiparalela incluye nucleótidos en el lado derecho de la molécula cuando se compara con el oligómero de 21 unidades típico; (b) las cadenas pueden no ser completamente complementarias, es decir, las cadenas pueden contener pares de emparejamientos erróneos simples; y (c) las modificaciones de la base, como el(los) ácidos nucleicos bloqueados, se pueden incluir en el extremo 5' de la cadena codificante.

En una tercera realización, la cadena codificante comprende de aproximadamente 25 a aproximadamente 28 nucleótidos (p. ej., 25, 26, 27 o 28 nucleótidos), en donde los 2 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena codificante son desoxirribonucleótidos. La cadena codificante contiene un fosfato en el extremo 5'. La cadena antiparalela comprende de aproximadamente 26 a aproximadamente 30 nucleótidos (p. ej., 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos) y contiene un extremo saliente 3' de 1-4 nucleótidos. Los nucleótidos que comprenden el extremo saliente 3' se modifican con ribonucleótidos modificados con 2'OMe. La cadena antiparalela contiene nucleótidos modificados con 2'OMe que alternan que empiezan en el primer monómero de la cadena antiparalela adyacente al extremo saliente 3' y que se extienden 15-19 nucleótidos desde el primer monómero adyacente al extremo saliente 3'. Por ejemplo, para una cadena antiparalela de 27 nucleótidos y contando la primera base en el extremo 5' de la cadena antiparalela como posición número 1, las modificaciones de 2'OMe se colocarán en las bases 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 26 y 27. En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene la siguiente estructura:



en donde "X" = ARN, "p" = un grupo fosfato, "X"= 2'OMe ARN, "Y" es un dominio saliente compuesto de 1, 2, 3 o 4 monómeros de ARN que son opcionalmente monómeros de ARN 2'OMe, y "D"= ADN. La cadena superior es la cadena codificante, y la hebra inferior es la cadena antiparalela.

En una cuarta realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene varias propiedades que potencian su procesamiento por Dicer. De acuerdo con esta realización, el ARNbc tiene una longitud suficiente para que sea procesado por Dicer para producir un ARNip y al menos una de las siguientes propiedades: (i) el ARNbc es asimétrico, p. ej., tiene un extremo saliente 3' en la cadena codificante; y (ii) el ARNbc tiene un extremo 3' modificado en la cadena antiparalela para dirigir la orientación de la unión de Dicer y el procesamiento del ARNbc a un ARNip activo. Según esta realización, la cadena codificante comprende de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos (p. ej., 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 nucleótidos) y la cadena antiparalela comprende de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos (p. ej., 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 nucleótidos). En una realización, el ARNbc sustrato de Dicer tiene un extremo saliente en el extremo 3' de la cadena codificante. En otra realización, la cadena antiparalela se modifica para la unión de Dicer y el procesamiento mediante modificadores adecuados situados en el extremo 3' de la cadena antiparalela. Los modificadores adecuados incluyen nucleótidos tales como desoxirribonucleótidos, aciclonucleótidos y similares, y moléculas con impedimento estérico tales como moléculas fluorescentes y similares. Cuando se usan modificadores de nucleótidos, reemplazan a los ribonucleótidos en el ARNbc de modo que la longitud del ARNbc no cambia. En otra realización, el ARNbc tiene un extremo saliente en el extremo 3' de la cadena codificante y la cadena antiparalela se modifica para el procesamiento de Dicer. En una realización, la cadena antiparalela tiene un 5'-fosfato. Las cadenas codificante y antiparalela se reasocian en condiciones biológicas, tales como las condiciones que se encuentran en el citoplasma de una célula. Además, una región de una de las secuencias, en particular de la cadena antiparalela, del ARNbc tiene una longitud de secuencia de al menos 19 nucleótidos, en donde estos nucleótidos son adyacentes al extremo 3' de la cadena antiparalela y son suficientemente complementarios de una secuencia de nucleótidos del ARN producido a partir del gen diana. Además, de acuerdo con esta realización, el ARNbc sustrato de Dicer también puede tener una o más de las

siguientes propiedades adicionales: (a) la cadena antiparalela tiene un desplazamiento hacia la izquierda desde el típico oligómero de 21 unidades (es decir, la cadena antiparalela incluye nucleótidos en el lado izquierdo de la molécula cuando se compara con el oligómero de 21 unidades típico; y (b) las cadenas pueden no ser completamente complementarias, es decir, las cadenas pueden contener emparejamientos erróneos simples.

5 En una realización preferida, el ARNbc sustrato de Dicer tiene una estructura asimétrica, con la cadena codificante que tiene 25 pares de bases de longitud, y la cadena antiparalela que tiene 27 pares de bases de longitud con un extremo saliente 3' de 2 bases. En ciertos casos, este ARNbc que tiene una estructura asimétrica contiene además 2 desoxinucleótidos en el extremo 3' de la cadena codificante en lugar de dos de los ribonucleótidos. En ciertos otros casos, este ARNbc que tiene una estructura asimétrica contiene además modificaciones 2'OMe en las posiciones 9, 10 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23 y 25 de la cadena antiparalela (en donde la primera base en el extremo 5' de la cadena antiparalela es la posición 1). En ciertos casos adicionales, este ARNbc que tiene una estructura asimétrica contiene además un extremo saliente 3' en la cadena antiparalela que comprende 1, 2, 3 o 4 nucleótidos 2'OMe (p. ej., un extremo saliente 3' de nucleótidos 2'OMe en las posiciones 26 y 27 en la cadena antiparalela).

15 En otra realización, los ARNbc sustrato Dicer se pueden diseñar seleccionando primero una secuencia de ARNip de cadena antiparalela que tiene una longitud de al menos 19 nucleótidos. En algunos casos, el ARNip antiparalelo se modifica para incluir de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 ribonucleótidos en el extremo 5' para proporcionar una longitud de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos. Cuando la cadena antiparalela tiene una longitud de 21 nucleótidos, se pueden añadir 3-9, preferiblemente 4-7, o más preferiblemente 6 nucleótidos en el extremo 5'. Aunque los ribonucleótidos añadidos pueden ser complementarios de la secuencia del gen diana, no se requiere la complementariedad completa entre la secuencia diana y el ARNip antiparalelo. Es decir, el ARNip antiparalelo resultante es suficientemente complementario con la secuencia diana. Después se produce una cadena codificante que tiene de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos. La cadena codificante es sustancialmente complementaria con la cadena antiparalela para asociarse con la cadena antiparalela en condiciones biológicas. En una realización, la cadena codificante se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para dirigir el procesamiento de Dicer de la cadena antiparalela. En otra realización, la cadena antiparalela del ARNbc tiene un extremo saliente 3'. En una realización adicional, la cadena codificante se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para la unión de Dicer y el procesamiento y la cadena antiparalela del ARNbc tiene un extremo saliente 3'.

20 En una realización relacionada, el ARNip antiparalelo se puede modificar para incluir de aproximadamente 1 a aproximadamente 9 ribonucleótidos en el extremo 5' para proporcionar una longitud de aproximadamente 22 a aproximadamente 28 nucleótidos. Cuando la cadena antiparalela tiene una longitud de 21 nucleótidos, se pueden añadir 1-7, preferiblemente 2-5, o más preferiblemente 4 ribonucleótidos en el extremo 3'. Los ribonucleótidos añadidos pueden tener cualquier secuencia. Aunque los ribonucleótidos añadidos pueden ser complementarios de la secuencia del gen diana, no se requiere una complementariedad completa entre la secuencia diana y el ARNip antiparalelo. Es decir, el ARNip antiparalelo resultante es suficientemente complementario con la secuencia diana. Después se produce una cadena codificante que tiene de aproximadamente 24 a aproximadamente 30 nucleótidos. La cadena codificante es sustancialmente complementaria con la cadena antiparalela para reasociarse con la cadena antiparalela en condiciones biológicas. En una realización, la cadena antiparalela se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para dirigir el procesamiento de Dicer. En otra realización, la cadena codificante del ARNbc tiene un extremo saliente 3'. En una realización adicional, la cadena antiparalela se sintetiza para que contenga un extremo 3' modificado para la unión de Dicer y el procesamiento y la cadena codificante del ARNbc tiene un extremo saliente 3'.

35 Se pueden identificar, sintetizar y modificar secuencias de ARNbc sustrato de Dicer adecuadas usando cualquier medio conocido en la técnica para diseñar, sintetizar y modificar secuencias de ARNip. En realizaciones particulares, los ARNbc sustrato de Dicer se administran usando un sistema portador tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNbc sustrato de Dicer; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales; y (c) un lípido no catiónico (p. ej., DPPC, DSPC, DSPE y/o colesterol). En ciertos casos, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender además un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (p. ej., PEG-DAA y/o POZ-DAA).

40 Se describen realizaciones adicionales relacionadas con los ARNbc sustrato de Dicer descritos en la presente memoria, así como los métodos de diseño y síntesis de dichos ARNbc en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2005/0244858, 2005/0277610 y 2007/0265220 y solicitud provisional de EE.UU. n° 61/184.652, presentada el 5 de junio de 2009.

### 3. ARNhc

45 Un "ARN de horquilla pequeña" o "ARN de horquilla corta" o "ARNhc" incluye una secuencia de ARN corta que hace un giro de horquilla estrecho que se puede usar para silenciar la expresión génica por interferencia de ARN. Los ARNhc descritos en la presente memoria se pueden sintetizar químicamente o transcribir a partir de un casete de transcripción en un plásmido de ADN. La estructura de horquilla del ARNhc es escindida por la maquinaria celular en ARNip, que después se une al complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC).

Los ARNhc descritos en la presente memoria típicamente son de aproximadamente 15-60, 15-50 o 15-40 (dúplex) nucleótidos de longitud, más típicamente de aproximadamente 15-30, 15-25 o 19-25 (dúplex) nucleótidos de longitud, y son preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22, o 21-23 (dúplex) nucleótidos de longitud (p. ej., cada secuencia complementaria del ARNhc bicatenario es de 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, preferiblemente de aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud, y el ARNhc bicatenario es de aproximadamente 15-60, 15-50, 15-40, 15-30, 15-25 o 19-25 pares de bases de longitud, preferiblemente de aproximadamente 18-22, 19-20, o 19-21 pares de bases de longitud). Los dúplex de ARNhc pueden comprender extremos salientes 3' de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o aproximadamente 2 a aproximadamente 3 nucleótidos en la cadena antiparalela y/o extremos 5'-fosfato en la cadena codificante. En algunas realizaciones, el ARNhc comprende una secuencia de cadena codificante y/o cadena antiparalela de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 nucleótidos de longitud (p. ej., aproximadamente 15-60, 15-55, 15-50, 15-45, 15-40, 15-35, 15-30 o 15-25 nucleótidos de longitud), preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 40 nucleótidos de longitud (p. ej., aproximadamente 19-40, 19-35, 19-30 o 19-25 nucleótidos de longitud), más preferiblemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud (p. ej., 19, 20, 21, 22 o 23 nucleótidos de longitud).

Los ejemplos no limitantes de ARNhc incluyen una molécula de polinucleótido bicatenaria ensamblada a partir de una molécula monocatenaria, donde las regiones codificante y antiparalela están unidas por un conector basado en ácido nucleico o no basado en ácido nucleico; y una molécula de polinucleótido bicatenaria con una estructura secundaria de horquilla que tiene regiones codificantes y antiparalelas complementarias. En realizaciones preferidas, las cadenas codificante y antiparalela del ARNhc están unidas por una estructura de bucle que comprende de aproximadamente 1 a aproximadamente 25 nucleótidos, de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 nucleótidos, de aproximadamente 4 a aproximadamente 15 nucleótidos, de aproximadamente 5 a aproximadamente 12 nucleótidos, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos.

Las secuencias de ARNhc adecuadas se pueden identificar, sintetizar y modificar usando cualquier medio conocido en la técnica para diseñar, sintetizar y modificar secuencias de ARNip. En realizaciones particulares, los ARNhc se administran usando un sistema portador tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNhc; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales; y (c) un lípido no catiónico (p. ej., DPPC, DSPC, DSPE y/o colesterol). En ciertos casos, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender además un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (p. ej., PEG-DAA y/o POZ-DAA).

Las realizaciones adicionales relacionadas con los ARNhc descritos en la presente memoria, así como los métodos de diseño y síntesis de dichos ARNhc, se describen en la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/184.652, presentada el 5 de junio de 2009.

#### 4. ARNia

Al igual que el ARNip, el ARN interferente asimétrico (ARNia) puede reclutar el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) y conducir al silenciamiento efectivo de una variedad de genes en células de mamíferos mediante la escisión específica de secuencia de la secuencia diana entre el nucleótido 10 y 11 respecto al extremo 5' de la cadena antiparalela (Sun et al., *Nat. Biotech.*, 26: 1379-1382 (2008)). Típicamente, una molécula de ARNia comprende un dúplex de ARN corto que tiene una cadena codificante y una cadena antiparalela, en donde el dúplex contiene extremos salientes en los extremos 3' y 5' de la cadena antiparalela. El ARNia es en general asimétrico porque la cadena codificante es más corta en ambos extremos cuando se compara con la cadena antiparalela complementaria. En algunos aspectos, las moléculas de ARNia se pueden diseñar, sintetizar y reasociar en condiciones similares a las usadas para las moléculas de ARNip. Como un ejemplo no limitante, las secuencias de ARNia se pueden seleccionar y generar usando los métodos descritos antes para seleccionar secuencias de ARNip.

En otra realización, se pueden diseñar dúplex de ARNia de varias longitudes (p. ej., aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 o 14-17 pares de bases), más típicamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 pares de bases) con extremos salientes en los extremos 3' y 5' de la cadena antiparalela para dirigirse a un ARNm de interés. En ciertos casos, la cadena codificante de la molécula de ARNia es de aproximadamente 10-25, 12-20, 12-19, 12-18, 13-17 o 14-17 nucleótidos de longitud, más típicamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleótidos de longitud. En ciertos otros casos, la cadena antiparalela de la molécula de ARNia es de aproximadamente 15-60, 15-50 o 15-40 nucleótidos de longitud, más típicamente de aproximadamente 15-30, 15-25 o 19-25 nucleótidos de longitud, y preferiblemente es de aproximadamente 20-24, 21-22 o 21-23 nucleótidos de longitud.

En algunas realizaciones, el extremo saliente antiparalelo 5' contiene uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos no directores (p. ej., "AA", "UU", "dTdT", etc.). En otras realizaciones, el extremo saliente antiparalelo 3' contiene uno, dos, tres, cuatro o más nucleótidos no directores (p. ej., "AA", "UU", "dTdT", etc.). En ciertos aspectos, las moléculas de ARNia descritas en la presente memoria pueden comprender uno o más nucleótidos modificados, p. ej., en la región de doble cadena (dúplex) y/o en los extremos salientes antiparalelos. Como un ejemplo no limitante, las secuencias de ARNip pueden comprender uno o más de los nucleótidos modificados descritos antes para las secuencias de ARNip. En una realización preferida, la molécula de ARNia comprende nucleótidos 2'OMe tales como, por ejemplo, nucleótidos 2'OMe-guanosina, nucleótidos 2'OMe-uridina, o sus mezclas.



En ciertas realizaciones, las moléculas de ARNiA pueden comprender una cadena antiparalela que corresponde a la cadena antiparalela de una molécula de ARNiP, p. ej., una de las moléculas de ARNiP descritas en la presente memoria. En realizaciones particulares, los ARNiA se administran usando un sistema portador tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de ARNiA; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales; y (c) un lípido no catiónico (p. ej., DPPC, DSPC, DSPE y/o colesterol). En ciertos casos, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender además un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (p. ej., PEG-DAA y/o POZ-DAA).

Las secuencias de ARNiA adecuadas se pueden identificar, sintetizar y modificar usando cualquier medio conocido en la técnica para diseñar, sintetizar y modificar secuencias de ARNiP. Realizaciones adicionales relacionadas con las moléculas de ARNiA descritas en la presente memoria se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2009/0291131 y publicación PCT n° WO 09/127060.

## 5. miRNA

En general, los microARN (miARN) son moléculas de ARN monocatenarias de aproximadamente 21-23 nucleótidos de longitud que regulan la expresión génica. Los miARN son codificados por genes a partir de cuyos ADN son transcritos, pero los miARN no se traducen en proteínas (ARN no codificante); en su lugar, cada transcrito primario (un pri-miRNA) es procesado en una estructura corta de tallo-bucle llamada pre-miRNA y, finalmente, en un miRNA maduro funcional. Las moléculas de miARN maduras son parcial o completamente complementarias a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm), y su función principal es regular por disminución la expresión génica. La identificación de las moléculas de miRNA se describe, p. ej., en Lagos-Quintana et al., *Science*, 294: 853-858; Lau et al., *Science*, 294: 858-862; y Lee et al., *Science*, 294: 862-864.

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

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

Las moléculas de miARN de mamífero normalmente son complementarias de un sitio en la UTR 3' de la secuencia del ARNm diana. En ciertos casos, la reasociación del miRNA con el ARNm diana inhibe la traducción de proteínas al bloquear la maquinaria de traducción de proteínas. En algunos otros casos, la reasociación del miRNA con el mRNA diana facilita la escisión y degradación del mRNA diana a través de un proceso similar a la interferencia de ARN (iARN). El miRNA también puede dirigirse a la metilación de los sitios genómicos que corresponden al mRNA dirigido. En general, el miRNA funciona en asociación con un complemento de proteínas denominadas colectivamente miRNP.

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

En realizaciones particulares, los miRNA se administran usando un sistema de vehículo tal como una partícula de ácido nucleico-lípido. En una realización preferida, la partícula de ácido nucleico-lípido comprende: (a) una o más moléculas de miARN; (b) un lípido catiónico de fórmula I o una de sus sales; y (c) un lípido no catiónico (p. ej., DPPC, DSPC, DSPE y/o colesterol). En ciertos casos, la partícula de ácido nucleico-lípido puede comprender además un lípido conjugado que evita la agregación de partículas (p. ej., PEG-DAA y/o POZ-DAA).

En otras realizaciones, se administran uno o más agentes que bloquean la actividad de un miARN que se dirige a un ARNm de interés usando una partícula lipídica descrita en la presente memoria (p. ej., una partícula de ácido

nucleico-lípido tal como LNP). Los ejemplos de agentes de bloqueo incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos de bloqueo estérico, oligonucleótidos de ácido nucleico bloqueado y morfolino-oligonucleótidos. Dichos agentes de bloqueo se pueden unir directamente al miRNA o al sitio de unión del miRNA en el ARNm diana.

5 Realizaciones adicionales relacionadas con las moléculas de miARN descritas en la presente memoria se describen en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2009/0291131 y publicación PCT n° WO 09/127060.

## 6. Oligonucleótidos antiparalelos

En una realización, el ácido nucleico es un oligonucleótido antiparalelo dirigido a un gen o secuencia diana de interés. Las expresiones "oligonucleótido antiparalelo" o "antiparalelo" incluyen oligonucleótidos que son complementarios de una secuencia de polinucleótido dirigida. Los oligonucleótidos antiparalelos son cadenas  
10 simples de ADN o ARN que son complementarias de una secuencia elegida. Los oligonucleótidos de ARN antiparalelos previenen la traducción de cadenas de ARN complementarias mediante la unión al ARN. Se pueden usar oligonucleótidos de ADN antiparalelos para dirigirse a un ARN específico, complementario (codificante o no codificante). Si se produce la unión, este híbrido de ADN/ARN puede ser degradado por la enzima ARNasa H. En una realización particular, los oligonucleótidos antiparalelos comprenden de aproximadamente 10 a  
15 aproximadamente 60 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. La expresión también abarca oligonucleótidos antiparalelos que pueden no ser exactamente complementarios al gen diana deseado. Por lo tanto, la presente descripción se puede usar en casos en los que se encuentran actividades específicas no diana con oligonucleótido antiparalelo, o donde una secuencia antiparalela que contiene uno o más emparejamientos erróneos con la secuencia diana es la más preferida para un uso particular.

20 Se ha demostrado que los oligonucleótidos antiparalelos son inhibidores efectivos y dirigidos de la síntesis de proteínas y, por consiguiente, se pueden usar para inhibir específicamente la síntesis de proteínas por un gen dirigido. La eficacia de los oligonucleótidos antiparalelos para inhibir la síntesis de proteínas está bien establecida. Por ejemplo, la síntesis de poligalacturonasa y el receptor muscarínico de acetilcolina tipo 2 son inhibidos por oligonucleótidos antiparalelos dirigidos a sus respectivas secuencias de ARNm (véase, patentes de EE.UU. n°  
25 5.739.119 y 5.759.829). Además, se han demostrado ejemplos de inhibición antiparalela con la proteína ciclina nuclear, el gen de multiresistencia a fármacos (MDR1), ICAM-1, E-selectina, STK-1, receptor de GABAA estriatal y EGF humano. (véase, Jaskulski et al., *Science*, 240: 1544-6 (1988); Vasanthakumar et al., *Cancer Commun.*, 1: 225-32 (1989); Peris et al., *Brain Res Mol Brain Res.*, 15: 57: 310-20 (1998); y patentes de EE.UU. n° 5.801.154; 5.789.573; 5.718.709 y 5.610.288). Además, también se han descrito construcciones antiparalelas que inhiben y se  
30 pueden usar para tratar una variedad de proliferaciones celulares anormales, p. ej., cáncer (véase, patentes de EE.UU. n° 5.747.470; 5.591.317; y 5.783.683).

Los métodos para producir oligonucleótidos antiparalelos son conocidos en la técnica y se pueden adaptar fácilmente para producir un oligonucleótido antiparalelo que se dirija a cualquier secuencia de polinucleótido. La selección de secuencias de oligonucleótidos antiparalelos específicas para una secuencia diana determinada se  
35 basa en el análisis de la secuencia diana elegida y la determinación de la estructura secundaria,  $T_m$ , energía de enlace, y estabilidad relativa. Los oligonucleótidos antiparalelos se pueden seleccionar basándose en su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana en una célula hospedante. Las regiones diana altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG y las secuencias que son sustancialmente  
40 complementarias a las regiones 5' del ARNm. Estos análisis de estructura secundaria y las consideraciones de selección del sitio diana se pueden realizar, por ejemplo, usando la v.4 del software de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biologie insights) y/o el software de algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-402 (1997)).

## 7. Ribozimas

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

Actualmente se conocen al menos seis variedades básicas de moléculas de ARN enzimáticas naturales. Cada una  
55 puede catalizar la hidrólisis de enlaces fosfodiéster del RNA en *trans* (y por lo tanto puede escindir otras moléculas de ARN) en condiciones fisiológicas. En general, los ácidos nucleicos enzimáticos actúan uniéndose primero a un ARN diana. Dicha unión se produce a través de la parte de unión a la diana de un ácido nucleico enzimático que se mantiene muy cerca de una parte enzimática de la molécula que actúa para escindir el ARN diana. Por lo tanto, el ácido nucleico enzimático primero reconoce y después se une a un ARN diana mediante emparejamiento de bases

complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para cortar el ARN diana. La escisión estratégica de dicho ARN diana destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada. Después de que un ácido nucleico enzimático se haya unido y escindido su diana de ARN, se libera de ese ARN para buscar otra diana y se puede unir repetidamente y escindir nuevas dianas.

5 La molécula de ácido nucleico enzimática se puede formar en motivo de cabeza de martillo, horquilla, virus de la hepatitis  $\delta$ , intrón del grupo I o ARN de RNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN), o ARN de *Neurospora VS*, por ejemplo. Se describen ejemplos específicos de motivos de cabeza de martillo, p. ej., en Rossi et al., *Nucleic Acids Res.*, 20: 4559-65 (1992). Se describen ejemplos de motivos de horquilla, p. ej., en documento EP 0360257, Hampel et al., *Biochemistry*, 28: 4929-33 (1989); Hampel et al., *Nucleic Acids Res.*, 18: 299-304 (1990); y  
10 patente de EE.UU. n° 5.631.359. Un ejemplo del motivo del virus de la hepatitis  $\delta$  se describe, p. ej., en Perrotta et al., *Biochemistry*, 31: 11843-52 (1992). Un ejemplo del motivo RNasaP se describe, p. ej., en Guerrier-Takada et al., *Cell*, 35: 849-57 (1983). Los ejemplos del motivo de ribozima del ARN de *Neurospora VS* se describen, p. ej., en Saville et al., *Cell*, 61: 685-96 (1990); Saville et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 88: 8826-30 (1991); Collins et al., *Biochemistry*, 32: 2795-9 (1993). Un ejemplo del intrón del grupo I se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. n°  
15 4.987.071. Las características importantes de las moléculas de ácido nucleico enzimáticas usadas de acuerdo con la presente descripción son que tienen un sitio de unión al sustrato específico que es complementario de una o más de las regiones de ADN o ARN del gen diana, y que tienen secuencias de nucleótidos dentro o alrededor del sitio de unión del sustrato que imparte una actividad de escisión de ARN a la molécula. Por lo tanto, las construcciones de ribozimas no necesitan limitarse a los motivos específicos mencionados en la presente memoria.

20 Los métodos para producir una ribozima dirigida a cualquier secuencia de polinucleótido son conocidos en la técnica. Las ribozimas se pueden diseñar como se describe, p. ej., en las publicaciones PCT n° WO 93/23569 y WO 94/02595, y sintetizar para el ensayo in vitro y/o in vivo como se describe en las mismas.

La actividad de la ribozima se puede optimizar alterando la longitud de los brazos de unión de la ribozima o sintetizando químicamente las ribozimas con modificaciones que evitan su degradación por las ribonucleasas  
25 séricas (véase, p. ej., publicaciones PCT n° WO 92/07065, WO 93/15187, WO 91/03162 y WO 94/13688; EP 92110298.4; y patente de EE.UU. n° 5.334.711, que describen diversas modificaciones químicas que se pueden hacer en los restos de azúcar de las moléculas de ARN enzimáticas), modificaciones que aumentan su eficacia en las células y la eliminación de las bases del tallo II para acortar los tiempos de síntesis del ARN y reducir los requisitos químicos.

### 30 8. Oligonucleótidos inmunoestimuladores

Los ácidos nucleicos asociados con las partículas lipídicas descritas en la presente memoria pueden ser inmunoestimuladores, incluyendo los oligonucleótidos inmunoestimuladores (ISS; de cadena simple o doble) capaces de inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a un sujeto, que puede ser un mamífero tal como un ser humano. Los ISS incluyen, p. ej., ciertos palíndromos que conducen a estructuras secundarias en  
35 horquilla (véase, Yamamoto et al., *J. Immunol.*, 148: 4072-6 (1992)), o motivos CpG, así como otras características de ISS conocidas (como multidominios G; véase; publicación PCT n° WO 96/11266).

Se considera que los ácidos nucleicos inmunoestimuladores no son específicos de secuencia cuando no se requiere que se unan específicamente y reduzcan la expresión de una secuencia diana para producir una respuesta inmunitaria. Por lo tanto, ciertos ácidos nucleicos inmunoestimuladores pueden comprender una secuencia que  
40 corresponde a una región de un gen o ARNm natural, pero todavía se pueden considerar ácidos nucleicos inmunoestimuladores no específicos de secuencia.

En una realización, el ácido nucleico u oligonucleótido inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido CpG. El oligonucleótido o dinucleótido CpG puede estar no metilado o metilado. En otra realización, el ácido nucleico inmunoestimulador comprende al menos un dinucleótido CpG que tiene una citosina metilada. En una realización, el  
45 ácido nucleico comprende un solo dinucleótido CpG, en donde la citosina en el dinucleótido CpG está metilada. En una realización alternativa, el ácido nucleico comprende al menos dos dinucleótidos CpG, en donde al menos una citosina en los dinucleótidos CpG está metilada. En una realización adicional, cada citosina en los dinucleótidos CpG presentes en la secuencia está metilada. En otra realización, el ácido nucleico comprende una pluralidad de dinucleótidos CpG, en donde al menos uno de los dinucleótidos CpG comprende una citosina metilada. Los  
50 ejemplos de oligonucleótidos inmunoestimuladores adecuados para usar en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se describen en las publicaciones PCT n° WO 02/069369, WO 01/15726 y WO 09/086558; patente de EE.UU. n° 6.406.705; y Raney y col., *J. Pharm. Exper. Ther.*, 298: 1185-92 (2001). En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos usados en las composiciones y 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 resto  
55 citosina metilada en un motivo CpG.

### B. Otros agentes activos

En ciertas realizaciones, el agente activo asociado con las partículas lipídicas descritas en la presente memoria puede comprender una o más proteínas, polipéptidos o moléculas o compuestos orgánicos pequeños terapéuticos.

- Los ejemplos no limitantes de dichos agentes o fármacos terapéuticamente eficaces incluyen fármacos oncológicos (p. ej., fármacos quimioterapéuticos, agentes terapéuticos hormonales, agentes inmunoterapéuticos, agentes radioterapéuticos, etc.), agentes hipolipemiantes, medicamentos antivirales, compuestos antiinflamatorios, antidepresivos, estimuladores, analgésicos, antibióticos, medicamentos anticonceptivos, antipiréticos, vasodilatadores, antiangiogénicos, agentes citovasculares, inhibidores de la transducción de señales, medicamentos cardiovasculares tales como agentes anti-arritmicos, hormonas, vasoconstrictores y esteroides. Estos agentes activos se pueden administrar solos en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, o en combinación (p. ej., coadministrados) con partículas lipídicas descritas en la presente memoria que comprenden ácido nucleico tal como ARN interferente.
- Los ejemplos no limitantes de fármacos de quimioterapia incluyen fármacos basados en platino (p. ej., oxaliplatino, cisplatino, carboplatino, espiroplatino, iproplatino, satraplatino, etc.), agentes alquilantes (p. ej., ciclofosfamida, ifosfamida, clorambucilo, busulfán, melfalán, mecloretamina, uramustina, tiotepá, nitrosoureas, etc.), anti-metabolitos (p. ej., 5-fluorouracilo (5-FU), azatioprina, metotrexato, leucovorina, capecitabina, citarabina, floxuridina, fludarabina, gemcitabina, pemetrexed, raltitrexed, etc.), alcaloides vegetales (p. ej., vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, podofilotoxina, paclitaxel (taxol), docetaxel, etc.), inhibidores de la topoisomerasa (p. ej., irinotecán (CPT-11; Camptosar), topotecán, amsacrina, etopósido (VP16), fosfato de etopósido, tenipósido, etc.), antibióticos antitumorales (p. ej., doxorubicina, adriamicina, daunorubicina, epirubicina, actinomicina, bleomicina, mitomicina, mitoxantrona, plicamicina, etc.), inhibidores de la tirosina quinasa (p. ej., gefitinib (Iressa®), sunitinib (Sutent®; SU11248), erlotinib (Tarceva®; OSI-1774), lapatinib (GW572016; GW2016), canertinib (CI 1033), semaxinib (SU5416), vatalanib (PTK787/ZK222584), sorafenib (BAY 43-9006), imatinib (Gleevec®; STI571), dasatinib (BMS-354825), leflunomida (SU101), vandetanib (Zactima™; ZD6474), etc.), sus sales farmacéuticamente aceptables, sus estereoisómeros, sus derivados, sus análogos y sus combinaciones.
- Los ejemplos de agentes terapéuticos hormonales convencionales incluyen, sin limitación, esteroides (p. ej., dexametasona), finasterida, inhibidores de aromatasas, tamoxifeno y goserelina, así como otros agonistas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH).
- Los ejemplos de agentes inmunoterapéuticos convencionales incluyen, entre otros, inmunoestimuladores (p. ej., bacilo de Calmette-Guérin (BCG), levamisol, interleuquina-2, interferón alfa, etc.), anticuerpos monoclonales (p. ej., anticuerpos monoclonales anti-CD20, anti-HER2, anti-CD52, anti-HLA-DR y anti-VEGF), inmunotoxinas (p. ej., conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD33-caliqueamicina, conjugado de anticuerpo monoclonal anti-CD22-exotoxina de pseudomonas, etc.), y radioinmunoterapia (p. ej., anticuerpo monoclonal anti-CD20 conjugado con  $^{111}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , o  $^{131}\text{I}$ , etc.).
- Los ejemplos de agentes radioterapéuticos convencionales incluyen, pero no se limitan a, radionúclidos tales como  $^{47}\text{Sc}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{86}\text{Y}$ ,  $^{87}\text{Y}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{105}\text{Rh}$ ,  $^{111}\text{Ag}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{117\text{m}}\text{Sn}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$  y  $^{212}\text{Bi}$ , opcionalmente conjugado con anticuerpos dirigidos contra antígenos tumorales.
- Los fármacos oncológicos adicionales que se pueden usar de acuerdo con la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, alkeran, alopurinol, altretamina, amifostina, anastrozol, araC, trióxido de arsénico, bexaroteno, biCNU, carmustina, CCNU, celecoxib, cladribina, ciclosporina A, arabinósido de citosina, citoxán, dexrazoxano, DTIC, estramustina, exemestano, FK506, gemtuzumab-ozogamicin, hidrea, hidroxiaurea, idarubicina, interferón, letrozol, leustatina, leuprolida, litretinoina, megastrol, L-PAM, mesna, metoxsalen, mitramicina, muestra nitrogenada, pamidronato, pegademasa, pentostatina, porfimer sódico, prednisona, rituxán, estreptozocina, STI-571, taxotere, temozolamida, VM-26, toremifeno, tretinoina, ATRA, valubicina y velban. Otros ejemplos de fármacos oncológicos que se pueden usar de acuerdo con la presente descripción son elipticina y análogos o derivados de la elipticina, eptilonas, inhibidores de la quinasa intracelular y camptotecinas.
- Los ejemplos no limitantes de agentes hipolipemiantes para tratar una enfermedad o trastorno lipídico asociado con niveles elevados de triglicéridos, colesterol y/o glucosa incluyen estatinas, fibratos, ezetimiba, tiazolidinaciones, niacina, bloqueadores beta, nitroglicerina, antagonistas del calcio, aceite de pescado, y sus mezclas.
- Los ejemplos de medicamentos antivirales incluyen, pero no se limitan a, abacavir, aciclovir, adefovir, amantadina, amprenavir, arbidol, atazanavir, atripla, cidofovir, combivir, darunavir, delavirdina, didanosina, docosanol, edoxudina, efavirenz, emtricitabina, enfuvirtida, entecavir, inhibidores de entrada, famciclovir, combinaciones de dosis fijas, fomivirsen, fosamprenavir, foscarnet, fosfonet, inhibidores de fusión, ganciclovir, ibacitabina, imunovir, idoxuridina, imiquimod, indinavir, inosina, inhibidores de integrasa, interferón tipo III (p. ej., moléculas de IFN- $\lambda$  tales como IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 y IFN- $\lambda$ 3), interferón tipo II (p. ej., IFN- $\gamma$ ), interferón tipo I (p. ej., IFN- $\alpha$  tal como IFN- $\alpha$  PEGilado, IFN- $\beta$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\tau$ , IFN- $\omega$  y IFN- $\zeta$ ), interferón, lamivudina, lopinavir, lovirodina, MK-0518, maraviroc, moroxidina, nelfinavir, nevirapina, nexavir, análogos de nucleósidos, oseltamivir, penciclovir, peramivir, pleconaril, podofilotoxina, inhibidores de proteasa, inhibidores de transcriptasa inversa, ribavirin, rimantadina, ritonavir, saquinavir, estavudina, potenciadores sinérgicos, tenofovir, tenofovir disoproxil, tipranavir, trifluridina, trizivir, tromantadina, trovada, valaciclovir, valganciclovir, vicriviroc, vidarabina, viramidina, zalcitabina, zanamivir, zidovudina, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus estereoisómeros, sus derivados, sus análogos y sus mezclas.

## V. Partículas lipídicas

En ciertos aspectos, en la presente memoria se describen partículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos (amino) o sus sales descritos en la presente memoria. En algunas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria comprenden además uno o más lípidos no catiónicos. En otras realizaciones, las partículas lipídicas comprenden además uno o más lípidos conjugados capaces de reducir o inhibir la agregación de partículas. En realizaciones adicionales, las partículas lipídicas comprenden además uno o más agentes activos o agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos terapéuticos (p. ej., ARN interferente tal como ARNip).

Las partículas lipídicas incluyen, pero no se limitan a, vesículas lipídicas tales como liposomas. Como se usa en la presente memoria, una vesícula lipídica incluye una estructura que tiene membranas que contienen lípidos que encierran un interior acuoso. En realizaciones particulares, las vesículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria se usan para encapsular ácidos nucleicos dentro de las vesículas lipídicas. En otras realizaciones, las vesículas lipídicas que comprenden uno o más de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria forman complejos con ácidos nucleicos para formar lipoplejos.

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

En realizaciones preferidas, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria son partículas de ácido nucleico-lípido (LNP) estables en suero que comprenden un ARN interferente (p. ej., ARNip, ARNbc sustrato de Dicer, ARNhc, ARNia y/o miRNA), un lípido catiónico (p. ej., uno o más lípidos catiónicos de fórmula I o sus sales como se expone en la presente memoria), un lípido no catiónico (p. ej., mezclas de uno o más fosfolípidos y colesterol), y un lípido conjugado que inhibe la agregación de las partículas (p. ej., uno o más conjugados de PEG-lípido y/o POZ-lípido). El LNP puede comprender al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más moléculas de ARN interferentes no modificadas y/o modificadas. Las partículas de ácido nucleico-lípido y su método de preparación se describen, p. ej., en las patentes de EE.UU. n° 5.753.613; 5.785.992; 5.705.385; 5.976.567; 5.981.501; 6.110.745; y 6.320.017; y publicación PCT n° WO 96/40964.

En las partículas de ácido nucleico-lípido descritas en la presente memoria, el ácido nucleico puede estar completamente encapsulado dentro de la parte lipídica de la partícula, protegiendo así al ácido nucleico de la degradación por nucleasa. En realizaciones preferidas, una LNP que comprende un ácido nucleico tal como un ARN interferente está completamente encapsulada dentro de la parte lipídica de la partícula, protegiendo así al ácido nucleico de la degradación por nucleasa. En ciertos casos, el ácido nucleico en la LNP no se degrada sustancialmente después de exposición de la partícula a una nucleasa a 37°C durante al menos aproximadamente 20, 30, 45 o 60 minutos. En ciertos otros casos, el ácido nucleico en la LNP no se degrada sustancialmente después de la incubación de la partícula en suero a 37°C durante al menos aproximadamente 30, 45 o 60 minutos o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34 o 36 horas. En otras realizaciones, el ácido nucleico forma complejo con la parte lipídica de la partícula. Uno de los beneficios de las formulaciones descritas en la presente memoria es que las composiciones de partículas de ácido nucleico-lípido son sustancialmente no tóxicas para mamíferos tales como seres humanos.

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

En el contexto de los ácidos nucleicos, la encapsulación completa se puede determinar llevando a cabo un ensayo de exclusión de membrana impermeable a colorante fluorescente, que usa un colorante que tiene una fluorescencia

potenciada cuando se asocia con el ácido nucleico. Colorantes específicos como OliGreen® y RiboGreen® (Invitrogen Corp.; Carlsbad, CA) están disponibles para la determinación cuantitativa de ADN plasmídico, desoxirribonucleótidos monocatenarios y/o ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios. La encapsulación se determina añadiendo el colorante a una formulación liposomal, midiendo la fluorescencia resultante y comparándola con la fluorescencia observada tras añadir una pequeña cantidad de detergente no iónico. La alteración mediada por detergente de la bicapa liposomal libera el ácido nucleico encapsulado, lo que le permite interactuar con el colorante impermeable a través de la membrana. La encapsulación de ácido nucleico se puede calcular como  $E = (I - I_0)/I_0$ , donde  $I$  e  $I_0$  se refieren a las intensidades de fluorescencia antes y después de la adición de detergente. (véase, Wheeler et al., *Gene Ther.*, 6: 271-281 (1999)).

En otras realizaciones, se describe en la presente memoria una composición de partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP) que comprende una pluralidad de partículas de ácido nucleico-lípido.

En algunos casos, la composición de LNP comprende ácido nucleico que está completamente encapsulado dentro de la parte lipídica de las partículas, de modo que de aproximadamente 30% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de las partículas tienen el ácido nucleico encapsulado en las mismas.

En otros casos, la composición de LNP comprende ácido nucleico que está completamente encapsulado dentro de la parte lipídica de las partículas, de modo que de aproximadamente 30% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 100%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 85% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 90% a aproximadamente 95%, de aproximadamente 30% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 40% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 50% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 60% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 70% a aproximadamente 90%, de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) del ácido nucleico introducido está encapsulado en las partículas.

Dependiendo del uso previsto de las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, las proporciones de los componentes se pueden variar y la eficacia de suministro de una formulación particular se puede medir usando p. ej., un ensayo de parámetros de liberación endosomal (ERP).

En realizaciones particulares, se describe en la presente memoria una composición de partículas lipídicas (p. ej., LNP) que comprende una pluralidad de partículas lipídicas descritas en la presente memoria y un antioxidante. En ciertos casos, el antioxidante en la composición de partículas lipídicas reduce, previene y/o inhibe la degradación de un lípido catiónico presente en la partícula lipídica. En casos en donde el agente activo es un ácido nucleico terapéutico tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip), el antioxidante en la composición de partículas lipídicas reduce, previene y/o inhibe la degradación de la carga útil del ácido nucleico, p. ej., reduciendo, previniendo y/o inhibiendo la formación de aductos entre el ácido nucleico y el lípido catiónico. Los ejemplos no limitantes de antioxidantes incluyen antioxidantes hidrófilos tales como agentes quelantes (p. ej., quelantes de metales tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), citrato y similares), antioxidantes lipófilos (p. ej., isómeros de vitamina E, polifenoles, y similares), sus sales; y mezclas de estos. Si es necesario, el antioxidante típicamente está presente en una cantidad suficiente para prevenir, inhibir y/o reducir la degradación del lípido catiónico y/o el agente activo presente en la partícula, p. ej., EDTA o una de sus sales al menos aproximadamente 20 mM, o citrato o una de sus sales al menos aproximadamente 100 mM. Un antioxidante tal como EDTA y/o citrato se puede incluir en cualquier etapa o en múltiples etapas en el procedimiento de formación de partículas lipídicas descrito en la Sección VI (p. ej., antes, durante y/o después de la formación de partículas lipídicas).

Realizaciones adicionales relacionadas con métodos para prevenir la degradación de lípidos catiónicos y/o agentes activos (p. ej., ácidos nucleicos terapéuticos) presentes en partículas lipídicas, las composiciones que comprenden

partículas lipídicas estabilizadas por estos métodos, los métodos para producir estas partículas lipídicas y los métodos de suministro y/o administración de estas partículas lipídicas se describen en la solicitud de patente Internacional nº PCT/CA2010/001919, titulada "Formulaciones SNALP que contienen antioxidantes", presentada el 1 de diciembre de 2010.

#### 5 A. Lípidos catiónicos

Cualquiera de los nuevos lípidos catiónicos de fórmula I o sus sales como se exponen en la presente memoria se pueden usar en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP), ya sea solo o en combinación con una o más especies de lípidos catiónicos o especies de lípidos no catiónicos.

Otros lípidos catiónicos o sus sales que también se pueden incluir en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a 1,2-dilinoileiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileniloxi-N,N-dimetilaminopropano (DLenDMA), 1,2-di- $\gamma$ -linoleniloxi-N,N-dimetilaminopropano ( $\gamma$ -DLenDMA), 1,2-dilinoileiloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDMA), 1,2-dilinoileiloxi-(N,N-dimetil)-butil-4-amina (C2-DLinDAP), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C2-DMA; también conocido como "XTC2" o "C2K"), 2,2-dilinoileil-4-(3-dimetilaminopropil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C3-DMA; "C3K"), 2,2-dilinoileil-4-(4-dimetilaminobutil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K-C4-DMA; "C4K"), 2,2-dilinoileil-5-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K6-DMA), 2,2-dilinoileil-4-N-metilpepiazino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MPZ), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dioleoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DO-K-DMA), 2,2-diestearoil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DS-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-N-morfolino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-MA), cloruro de 2,2-dilinoileil-4-trimetilamino-[1,3]-dioxolano (DLin-K-TMA.Cl), 2,2-dilinoileil-4,5-bis(dimetilaminometil)-[1,3]-dioxolano (DLin-K<sup>2</sup>-DMA), 2,2-dilinoileil-4-metilpiperazina-[1,3]-dioxolano (D-Lin-K-N-metilpiperazina), 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-ilo (DLin-M-C3-DMA; "MC3"), 3-dimetilaminopropionato de dilinoileilmetilo (DLin-M-C2-DMA; también conocido como DLin-M-K-DMA o DLin-M-DMA), 1,2-dioleilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DO-C-DAP), 1,2-dimiristoleil-3-dimetilaminopropano (DMDAP), cloruro de 1,2-dioleoil-3-trimetilaminopropano (DOTAP.Cl), 1,2-dilinoileilcarbamoiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileioxi-3-(dimetilamino)acetoxipropano (DLin-DAC), 1,2-dilinoileioxi-3-morfolinopropano (DLin-MA), 1,2-dilinoileoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 1,2-dilinoileilitio-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1-linoileoil-2-linoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-2-DMAP), sal de cloruro de 1,2-dilinoileiloxi-3-trimetilaminopropano (DLin-TMA.Cl), sal de cloruro de 1,2-dilinoileoil-3-trimetilaminopropano (DLin-TAP.Cl), 1,2-dilinoileiloxi-3-(N-metilpiperazino)propano (DLin-MPZ), 3-(N,N-dilinoileilamino)-1,2-propanodiol (DLinAP), 3-(N,N-dioleilamino)-1,2-propanodio (DOAP), 1,2-dilinoileiloxo-3-(2-N,N-dimetilamino)etoxipropano (DLin-EG-DMA), 3-dimetilamino-2-(colest-5-en-3-beta-oxibutan-4-oxi)-1-(cis,cis-9,12-octadecadienoxi)propano (CLinDMA), 2-[5'-(colest-5-en-3-beta-oxi)-3'-oxapentoxi]-3-dimetil-1-(cis,cis-9',1'-2'-octadecadienoxi)propano (CpLinDMA), N,N-dimetil-3,4-dioleiloxibencilamina (DMOBA), 1,2-N,N'-dioleilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DOcarbDAP), 1,2-N,N'-dilinoileilcarbamil-3-dimetilaminopropano (DLincarbDAP), cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-dioleiloxi-N,N-dimetilaminopropano (DODMA), 1,2-diesteariloxi-N,N-dimetilaminopropano (DSDMA), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), bromuro de N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), cloruro de N-(1-(2,3-dioleiloxi)propil)-N,N,N-trimetilamonio (DOTAP), 3-(N-(N',N'-dimetilamino)etano)-carbamoilcolesterol (DC-Chol), bromuro de N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE), trifluoroacetato de 2,3-dioleiloxi-N-[2(espermina-carboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanaminio (DOSPA), dioctadecilamidoglicil-espermina (DOGS), sus análogos, y sus mezclas.

Lípidos catiónicos adicionales o sus sales que pueden estar presentes en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen nuevos lípidos catiónicos tales como CP-LenMC3, CP- $\gamma$ -LenMC3, CP-MC3, CP-DLen-C2K-DMA, CP- $\gamma$ DLen-C2K-DMA, CP-C2K-DMA, CP-DODMA, CP-DPetroDMA, CP-DLinDMA, CP-DLenDMA, CP- $\gamma$ DLenDMA, sus análogos, y sus combinaciones. Lípidos catiónicos adicionales o sus sales que pueden estar presentes en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen análogos de MC3 tales como LenMC3,  $\gamma$ -LenMC3, MC3MC, MC2C, MC2MC, tioéster de MC3, éter de MC3, éter de MC4, MC3-alquino, MC3-amida, Pan-MC3, Pan-MC4, Pan-MC5, y sus combinaciones. Los lípidos catiónicos adicionales o sus sales que pueden estar presentes en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen los nuevos lípidos catiónicos descritos en la solicitud de patente internacional nº PCT/CA2010/001029, titulada "Lípidos catiónicos mejorados y métodos para el suministro de ácidos nucleicos", presentada el 30 de junio de 2010. Los lípidos catiónicos adicionales o sus sales que pueden estar presentes en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria incluyen los lípidos catiónicos descritos en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2009/0023673.

En algunas realizaciones, el lípido catiónico adicional forma una sal (preferiblemente una sal cristalina) con uno o más aniones. En una realización particular, el lípido catiónico adicional es su sal de oxalato (p. ej., hemioxalato), que es preferiblemente una sal cristalina.

La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLinDMA y DLenDMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2006/0083780.

La síntesis de lípidos catiónicos tales como  $\gamma$ -DLinDMA, C2-DLinDMA y C2-DLinDAP, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en solicitud de patente internacional n° PCT/CA2010/001029, titulada "Lípidos catiónicos mejorados y métodos para el suministro de ácidos nucleicos", presentada el 30 de junio de 2010.

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

10 La síntesis de lípidos catiónicos tales como DLin-K-C2-DMA, DLin-K-C3-DMA, DLin-K-C4-DMA, DLin-K6-DMA, DLin-K-MPZ, DO-K-DMA, DS-K-DMA, DLin-K-MA, DLin-K-TMA.Cl, DLin-K<sup>2</sup>-DMA, D-Lin-K-N-metilpiperzina, DLin-M-C2-DMA, DO-C-DAP, DMDAP, y DOTAP.Cl, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en la publicación PCT n° WO 2010/042877, titulada "Amino-lípidos mejorados y métodos para el suministro de ácidos nucleicos", presentada el 9 de octubre de 2009.

La síntesis de DLin-M-C3-DMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe, por ejemplo, en la solicitud provisional de EE.UU. n° 61/384,050, presentada el 17 de septiembre de 2010, titulada "Nuevos lípidos catiónicos y sus métodos de uso".

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

La síntesis de lípidos catiónicos tales como CLinDMA, así como lípidos catiónicos adicionales, se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2006/0240554.

20 La síntesis de una serie de otros lípidos catiónicos y análogos relacionados se ha descrito en las patentes de EE.UU. n° 5.208.036; 5.264.618; 5.279.833; 5.283.185; 5.753.613; y 5.785.992; y publicación PCT n° WO 96/10390. Además, se puede usar una serie de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos, tales como, p. ej., LIPOFECTIN® (que incluye DOTMA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL); LIPOFECTAMINA® (que incluye DOSPA y DOPE, disponible en GIBCO/BRL); y TRANSFECTAM® (que incluye DOGS, disponible en Promega Corp.).

25 En algunas realizaciones, el lípido catiónico comprende de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 90% en moles, de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 85% en moles, de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 80% en moles, de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 75% en moles, de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 70% en moles, de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 65% en moles, de aproximadamente 50% en moles a aproximadamente 60% en moles, de aproximadamente 55% en moles a aproximadamente 65% en moles, o de aproximadamente 55% en moles a  
30 aproximadamente 70% en moles (o cualquier de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula. En realizaciones particulares, el lípido catiónico comprende aproximadamente 50% en moles, 51% en moles, 52% en moles, 53% en moles, 54% en moles, 55% en moles, 56% en moles, 57% en moles, 58% en moles, 59% en moles, 60% en moles, 61% en moles, 62% en moles, 63% en moles, 64% en moles, o 65% en moles (o cualquiera de sus fracciones) de los lípidos presentes en la partícula.

35 En otras realizaciones, el lípido catiónico comprende de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 60% en moles, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 50% en moles, de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 50% en moles, de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 50% en moles, de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 40% en moles, o aproximadamente 40% en moles (o cualquier de sus fracciones o intervalo de  
40 estos) de los lípidos totales presentes en la partícula.

Se describen porcentajes e intervalos adicionales de lípidos catiónicos adecuados para usar en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, por ejemplo, en la publicación PCT n° WO 09/127060.

45 Debe entenderse que el porcentaje de lípido catiónico presente en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria es una cantidad objetivo, y que la cantidad real de lípido catiónico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en  $\pm 5\%$  en moles. Por ejemplo, en la formulación de partículas lipídicas 1:57 (p. ej., LNP), la cantidad objetivo de lípido catiónico es 57,1% en moles, pero la cantidad real de lípido catiónico puede ser  $\pm 5\%$  en moles,  $\pm 4\%$  en moles,  $\pm 3\%$  en moles,  $\pm 2\%$  en moles,  $\pm 1\%$  en moles,  $\pm 0.75\%$  en moles,  $\pm 0.5\%$  en moles,  $\pm 0.25\%$  en moles, o  $\pm 0.1\%$  en moles de esa cantidad objetivo, estando compuesta el resto de la formulación de otros componentes lipídicos (que suman hasta 100% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula).

50 B. Lípidos no catiónicos

Los lípidos no catiónicos usados en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) pueden ser cualesquiera de una variedad de lípidos no cargados neutros, de ion híbrido o aniónicos capaces de producir un complejo estable.

55 Los ejemplos no limitantes de lípidos no catiónicos incluyen fosfolípidos tales como lecitina, fosfatidiletanolamina, lisolecitina, lisofosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, esfingomielina de huevo (ESM),



5 cefalina, cardiopina, ácido fosfatídico, cerebrósidos, dicetilfosfato, diestearoilfosfatidilcolina (DSPC),  
 dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG),  
 dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), palmitoiloleoil-fosfatidilcolina (POPC),  
 palmitoiloleoil-fosfatidiletanolamina (POPE), palmitoiloleoil-fosfatidilglicerol (POPG), 4-(N-maleimidometil)-  
 10 ciclohexano-1-carboxilato de dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE-mal), dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE),  
 dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE), diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE), monometil-fosfatidiletanolamina,  
 dimetil-fosfatidiletanolamina, dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE), estearoiloleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE),  
 lisofosfatidilcolina, dilinoleoilfosfatidilcolina, y sus mezclas. También se pueden usar otros fosfolípidos de  
 10 diacilfosfatidilcolina y diacilfosfatidiletanolamina. Los grupos acilo en estos lípidos preferiblemente son grupos acilo  
 u oleilo.

Los ejemplos adicionales de lípidos no catiónicos incluyen esteroides tales como colesterol y sus derivados. Los  
 ejemplos no limitantes de derivados de colesterol incluyen análogos polares tales como 5 $\alpha$ -colestanol, 5 $\beta$ -  
 15 coprostanol, éter de colesteroil y (2'-hidroxi)-etilo, éter de colesteroil y (4'-hidroxi)-butilo, y 6-cetocolestanol; análogos  
 no polares tales como 5 $\alpha$ -colestano, colesteno, 5 $\alpha$ -colestano, 5 $\beta$ -colestano y decanoato de colesteroil; y sus  
 mezclas. En realizaciones preferidas, el derivado de colesterol es un análogo polar tal como éter de colesteroil y (4'-  
 15 hidroxi)butilo. La síntesis de éter de colesteroil y (2'-hidroxi)-etilo se describe en la publicación PCT n<sup>o</sup> WO  
 09/127060.

20 En algunas realizaciones, el lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (p. ej., LNP) comprende o  
 consiste en una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol o uno de sus derivados. En otras realizaciones, el  
 lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas (p. ej., LNP) comprende o consiste en uno o más fosfolípidos,  
 p. ej., una formulación de partículas lipídicas exentas de colesterol. En otras realizaciones más, el lípido no catiónico  
 presente en las partículas lipídicas (p. ej., LNP) comprende o consiste en colesterol o uno de sus derivados, p. ej.,  
 una formulación de partículas lipídicas exentas de fosfolípidos.

25 Otros ejemplos de lípidos no catiónicos adecuados para usar en la presente memoria incluyen lípidos que no  
 contienen fósforo, tales como p. ej., estearilamina, dodecilamina, hexadecilamina, acetil-palmitato, glicerolricinoleato,  
 estereato de hexadecilo, miristato de isopropilo, polímeros acrílicos anfóteros, trietanolamina-lauril-sulfato, alquil-aril-  
 sulfato amidas de ácido graso polietoxiladas, bromuro de dioctadecildimetilamonio, ceramida, esfingomielina, y  
 similares.

30 En algunas realizaciones, el lípido no catiónico comprende de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente  
 60% en moles, de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 55% en moles, de aproximadamente 20%  
 en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en  
 moles, de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 50% en moles, de aproximadamente 25% en moles  
 a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 50% en moles, de  
 35 aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 30% en moles a  
 aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 35% en moles a aproximadamente 45% en moles, de  
 aproximadamente 37% en moles a aproximadamente 42% en moles, o aproximadamente 35% en moles, 36% en  
 moles, 37% en moles, 38% en moles, 39% en moles, 40% en moles, 41% en moles, 42% en moles, 43% en moles,  
 40 44% en moles, o 45% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes  
 en la partícula.

En realizaciones donde las partículas lipídicas contienen una mezcla de fosfolípido y colesterol o un derivado de  
 colesterol, la mezcla puede comprender hasta aproximadamente 40% en moles, 45% en moles, 50% en moles, 55%  
 en moles o 60% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula.

45 En algunas realizaciones, el componente de fosfolípido en la mezcla puede comprender de aproximadamente 2% en  
 moles a aproximadamente 20% en moles, de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 15% en moles, de  
 aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 12% en moles, de aproximadamente 4% en moles a  
 aproximadamente 15% en moles, o de aproximadamente 4% en moles a aproximadamente 10% en moles (o  
 cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula. En ciertas  
 50 realizaciones preferidas, el componente de fosfolípido en la mezcla comprende de aproximadamente 5% en moles a  
 aproximadamente 10% en moles, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 9% en moles, de  
 aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 8% en moles, de aproximadamente 6% en moles a  
 aproximadamente 9% en moles, de aproximadamente 6% en moles a aproximadamente 8% en moles, o  
 aproximadamente 5% en moles, 6% en moles, 7% en moles, 8% en moles, 9% en moles o 10% en moles (o  
 cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula. Como un ejemplo  
 55 no limitante, una formulación de partículas lipídicas 1:57 que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol,  
 puede comprender un fosfolípido tal como DPPC o DSPC en aproximadamente 7% en moles (o cualquiera de sus  
 fracciones), p. ej., en una mezcla con colesterol o un derivado de colesterol en aproximadamente 34% en moles (o  
 cualquiera de sus fracciones) de los lípidos totales presentes en la partícula. Como otro ejemplo no limitante, una  
 formulación de partículas lipídicas 7:54 que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender un  
 60 fosfolípido tal como DPPC o DSPC en aproximadamente 7% en moles (o cualquiera de sus fracciones), p. ej., en

una mezcla con colesterol o un derivado de colesterol en aproximadamente 32% en moles (o cualquiera de sus fracciones) de los lípidos totales presentes en la partícula.

En otras realizaciones, el componente de colesterol en la mezcla puede comprender de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 27% en moles a aproximadamente 37% en moles, de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 30% en moles, o de aproximadamente 35% en moles a aproximadamente 40% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula. En ciertas realizaciones preferidas, el componente de colesterol en la mezcla comprende de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 35% en moles, de aproximadamente 27% en moles a aproximadamente 35% en moles, de aproximadamente 29% en moles a aproximadamente 35% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 35% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 34% en moles, de aproximadamente 31% en moles a aproximadamente 33% en moles, o aproximadamente 30% en moles, 31% en moles, 32% en moles, 33% en moles, 34% en moles o 35% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula. Típicamente, una formulación de partículas lipídicas 1:57 que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol o un derivado de colesterol en aproximadamente 34% en moles (o cualquiera de sus fracciones), p. ej., en una mezcla con un fosfolípido tal como DPPC o DSPC, en aproximadamente 7% en moles (o cualquiera de sus fracciones) de los lípidos totales presentes en la partícula. Típicamente, una formulación de partículas lipídicas 7:54 que comprende una mezcla de fosfolípido y colesterol puede comprender colesterol o un derivado de colesterol en aproximadamente 32% en moles (o cualquiera de sus fracciones), p. ej., en una mezcla con un fosfolípido tal como DPPC o DSPC, en aproximadamente 7% en moles (o cualquiera de sus fracciones) de los lípidos totales presentes en la partícula.

En realizaciones donde las partículas lipídicas están exentas de colesterol, el colesterol o su derivado puede comprender hasta aproximadamente 25% en moles, 30% en moles, 35% en moles, 40% en moles, 45% en moles, 50% en moles, 55% en moles, o 60% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula.

En algunas realizaciones, el colesterol o su derivado en la formulación de partículas lipídicas exentas de fosfolípido puede comprender de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 40% en moles, de aproximadamente 31% en moles a aproximadamente 39% en moles, de aproximadamente 32% en moles a aproximadamente 38% en moles, de aproximadamente 33% en moles a aproximadamente 37% en moles, de aproximadamente 35% en moles a aproximadamente 45% en moles, de aproximadamente 30% en moles a aproximadamente 35% en moles, de aproximadamente 35% en moles a aproximadamente 40% en moles, o aproximadamente 30% en moles, 31% en moles, 32% en moles, 33% en moles, 34% en moles, 35% en moles, 36% en moles, 37% en moles, 38% en moles, 39% en moles, o 40% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula. Como un ejemplo no limitante, una formulación de partículas lipídicas 1:62 puede comprender colesterol en aproximadamente 37% en moles (o cualquiera de sus fracciones) de los lípidos totales presentes en la partícula. Como otro ejemplo no limitante, una formulación de partículas lipídicas 7:58 puede comprender colesterol en aproximadamente 35% en moles (o cualquiera de sus fracciones) de los lípidos totales presentes en la partícula.

En otras realizaciones, el lípido no catiónico comprende de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 90% en moles, de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 85% en moles, de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 80% en moles, aproximadamente 10% en moles (p. ej., solo fosfolípido), o aproximadamente 60% en moles (p. ej., fosfolípido y colesterol o su derivado) (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula.

Se describen porcentajes e intervalos adicionales de lípidos no catiónicos adecuados para usar en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, por ejemplo, en la publicación PCT n° WO 09/127060.

Debe entenderse que el porcentaje de lípido no catiónico presente en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria es una cantidad objetivo, y que la cantidad real de lípido no catiónico presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en  $\pm 5\%$  en moles. Por ejemplo, en la formulación de partículas lipídicas 1:57 (p. ej., LNP), la cantidad objetivo de fosfolípido es 7,1% en moles y la cantidad objetivo de colesterol es 34,3% en moles, pero la cantidad real de fosfolípido puede ser  $\pm 2\%$  en moles,  $\pm 1,5\%$  en moles,  $\pm 1\%$  en moles,  $\pm 0,75\%$  en moles,  $\pm 0,5\%$  en moles,  $\pm 0,25\%$  en moles, o  $\pm 0,1\%$  en moles de la cantidad objetivo, y la cantidad real de colesterol puede ser  $\pm 3\%$  en moles,  $\pm 2\%$  en moles,  $\pm 1\%$  en moles,  $\pm 0,75\%$  en moles,  $\pm 0,5\%$  en moles,  $\pm 0,25\%$  en moles, o  $\pm 0,1\%$  en moles de esa cantidad objetivo, estando compuesta el resto de la formulación de otros componentes lipídicos (que suman hasta 100% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula). Igualmente, en la formulación de partículas lipídicas 7:54 (p. ej., LNP), la cantidad objetivo de fosfolípido es 6,75% en moles y la cantidad objetivo de colesterol es 32,43% en moles, pero la cantidad real de fosfolípido puede ser  $\pm 2\%$  en moles,  $\pm 1,5\%$  en moles,  $\pm 1\%$  en moles,  $\pm 0,75\%$  en moles,  $\pm 0,5\%$  en moles,  $\pm 0,25\%$  en moles, o  $\pm 0,1\%$  en moles de esa cantidad objetivo, y la cantidad real de colesterol puede ser  $\pm 3\%$  en moles,  $\pm 2\%$  en moles,  $\pm 1\%$  en moles,  $\pm 0,75\%$  en moles,  $\pm 0,5\%$  en

moles,  $\pm 0,25\%$  en moles, o  $\pm 0,1\%$  en moles de esa cantidad objetivo, estando compuesta el resto de la formulación de otros componentes lipídicos (que suman hasta 100% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula).

### C. Conjugados de lípidos

5 Además de los lípidos catiónicos y no catiónicos, las partículas lipídicas de la invención (p. ej., LNP) pueden comprender además un conjugado lipídico. El lípido conjugado es útil en cuanto que previene la agregación de partículas. Los lípidos conjugados adecuados incluyen, pero no se limitan a conjugados de PEG-lípido, conjugados de POZ-lípido, conjugados de ATTA-lípido, conjugados de polímero catiónico-lípido (CPL) y sus mezclas. En ciertas realizaciones, las partículas comprenden un conjugado de PEG-lípido o un conjugado de ATTA-lípido junto con un CPL.

10 En una realización preferida, el conjugado lipídico es un PEG-lípido. Los ejemplos de PEG-lípidos incluyen, pero no se limitan a PEG acoplado a dialquiloilpropilos (PEG-DAA) como se describe, p. ej., en la publicación PCT n° WO 05/026372, PEG acoplado a diacilglicerol (PEG-DAG) como se describe, p. ej., en las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. n° 2003/0077829 y 2005/008689, PEG acoplado a fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina (PEG-PE), PEG conjugado con ceramidas como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. n° 5.885.613, PEG conjugado con colesterol o uno de sus derivados, y sus mezclas.

15 Los PEG-lípidos adicionales adecuados para usar en la invención incluyen, sin limitación, mPEG2000-1,2-di-O-*sn*-3-carbomilglicerido (PEG-C-DOMG). La síntesis de PEG-C-DOMG se describe en la publicación PCT n° WO 09/086558. Conjugados de PEG-lípidos adecuados adicionales más incluyen, sin limitación, 1-[8'-(1,2-dimiristoil-3-propanoxi)-carboxamido-3',6'-dioxaoctanil]carbamoil- $\omega$ -metil-poli(etilenglicol)) (2KPEG-DMG). La síntesis de 2KPEG-DMG se describe en la patente de EE.UU. n° 7.404.969.

20 PEG es un polímero lineal soluble en agua de unidades de etileno PEG que se repiten con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares; por ejemplo, PEG 2000 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 daltons, y PEG 5000 tiene un peso molecular medio de aproximadamente 5.000 daltons. Los PEG están disponibles en el mercado en Sigma Chemical Co. y otras empresas e incluyen, pero no se limitan a los siguientes: monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil-succinato (MePEG-S-NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH<sub>2</sub>), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM), así como compuestos que contienen un grupo hidroxilo terminal en lugar de uno grupo metoxi terminal (p. ej., HO-PEG-S, HO-PEG-S-NHS, HO-PEG-NH<sub>2</sub>, etc.). Otros PEG tales como los descritos en las patentes de EE.UU. n° 6.774.180 y 7.053.150 (p. ej., mPEG (20 KDa) amina) también es útil para preparar los conjugados de PEG-lípidos descritos en la presente memoria. Además, el ácido monometoxipolietilenglicol-acético (MePEG-CH<sub>2</sub>COOH) es particularmente útil para preparar conjugados de PEG-lípidos que incluyen, p. ej., conjugados de PEG-DAA.

35 El resto de PEG de los conjugados de PEG-lípidos descritos en la presente memoria puede comprender un peso molecular medio que está en el intervalo de aproximadamente 550 daltons y aproximadamente 10.000 daltons. En ciertos casos, el resto de PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (p. ej., de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, etc.). En realizaciones preferidas, el resto de PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 daltons o aproximadamente 750 daltons.

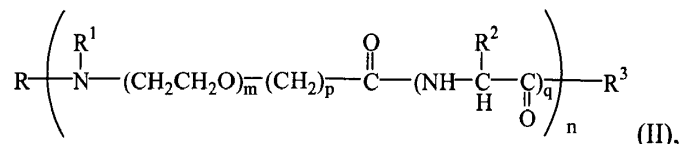
40 En ciertos casos, el PEG puede estar opcionalmente sustituido con un grupo alquilo, alcoxi, acilo o arilo. El PEG se puede conjugar directamente con el lípido o se puede unir al lípido a través de un resto conector. Se puede usar cualquier resto conector adecuado para acoplar el PEG a un lípido, incluyendo, p. ej., restos conectores que no contienen éster y restos conectores que contienen éster. En una realización preferida, el resto conector es un resto conector que no contiene éster. Como se usa en la presente memoria, la expresión "resto conector que no contiene éster" se refiere a un resto conector que no contiene un enlace de éster carboxílico (-OC(O)-). Los restos conectores que no contienen éster adecuados incluyen, pero no se limitan a amido (-C(O)NH-), amino (-NR-), carbonilo (-C(O)-), carbamato (-NHC(O)O-), urea (-NHC(O)NH-), disulfuro (-S-S-), éter (-O-), succinilo (-C(O)CCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)-), succinamidilo (-NHC(O)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>C(O)NH-), éter, disulfuro, así como sus combinaciones (tal como un conector que contiene tanto un resto conector carbamato como un resto conector amido). En una realización preferida, el conector carbamato se usa para acoplar el PEG al lípido.

45 En otras realizaciones, se usa un resto conector que contiene éster para acoplar el PEG al lípido. Los restos conectores que contienen éster adecuados incluyen, p. ej., carbonato (-OC(O)O-), succinilo, ésteres de fosfato (-O(O)POH-O-), ésteres de sulfonato, y sus combinaciones.

55 Las fosfatidiletanolaminas que tienen una variedad de grupos de cadena acilo de longitudes de cadena y grados de saturación variables se pueden conjugar con PEG para formar el conjugado lipídico. Dichas fosfatidiletanolaminas están disponibles en el mercado, o se pueden aislar o sintetizar usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Las fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadenas de carbono en el intervalo de C<sub>10</sub> a C<sub>20</sub> son las preferidas. También se pueden usar

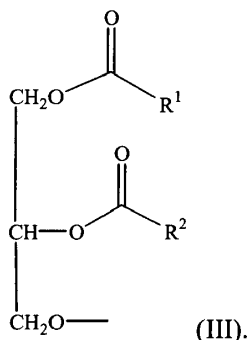
fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono o diinsaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Las fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen, pero no se limitan a dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE).

- 5 El término "ATTA" o "poliamida" incluye, sin limitación, los compuestos descritos en las patentes de EE.UU. nº 6.320.017 y 6.586.559. Estos compuestos incluyen un compuesto que tiene la fórmula:

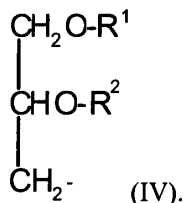


- 10 en donde R es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo y acilo; R<sup>1</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo; u opcionalmente, R y R<sup>1</sup> y el nitrógeno al que están unidos forman un resto azido; R<sup>2</sup> es un miembro del grupo seleccionado de hidrógeno, alquilo opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido y una cadena lateral de un aminoácido; R<sup>3</sup> es un miembro seleccionado del grupo que consiste en hidrógeno, halógeno, hidroxilo, alcoxi, mercapto, hidrazino, amino y NR<sup>4</sup>R<sup>5</sup>, en donde R<sup>4</sup> y R<sup>5</sup> son independientemente hidrógeno o alquilo; n es de 4 a 80; m es de 2 a 6; p es de 1 a 4; y q es de 0 o 1. Será evidente para los expertos en la técnica que se pueden usar otras poliamidas en los compuestos descritos en la presente memoria.
- 15

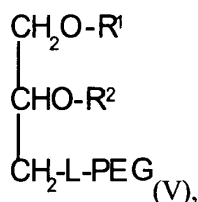
- El término "diacilglicerol" o "DAG" incluye un compuesto que tiene 2 cadenas de acilo graso, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, las cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos unidos a las posiciones 1 y 2 de glicerol por enlaces éster. Los grupos acilo pueden ser saturados o tener grados de insaturación variables. Los grupos acilo adecuados incluyen, pero no se limitan a, lauroilo (C<sub>12</sub>), miristoilo (C<sub>14</sub>), palmitoilo (C<sub>16</sub>), estearoilo (C<sub>18</sub>) e icosoilo (C<sub>20</sub>). En realizaciones preferidas, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales, es decir, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos miristoilo (es decir, dimiristoil), R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos estearoilos (es decir, distearoilo), etc. Los diacilgliceroles tienen la siguiente fórmula general:
- 20



- El término "dialquioxipropilo" o "DAA" incluye un compuesto que tiene 2 cadenas de alquilo, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup>, las cuales tienen independientemente entre 2 y 30 carbonos. Los grupos alquilo pueden ser saturados o tener grados de insaturación variables. Los dialquioxipropilos tienen la siguiente fórmula general:
- 25



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



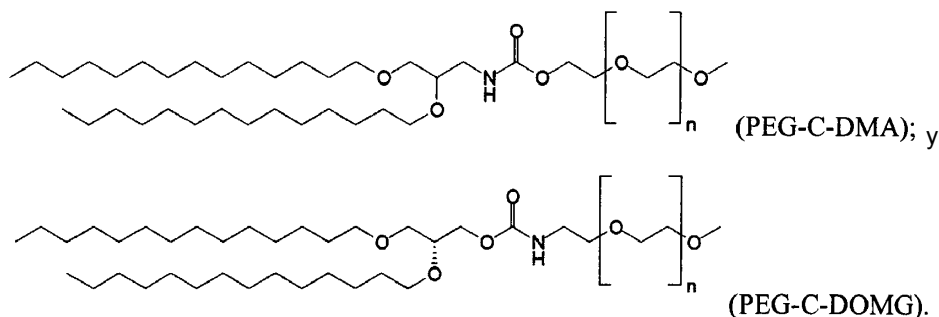
- 30 en donde R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> se seleccionan independientemente y son grupos alquilo de cadena larga que tienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 22 átomos de carbono; PEG es un polietilenglicol; y L es un resto conector

que no contiene éster o un resto conector que contiene éster como se ha descrito antes. Los grupos alquilo de cadena larga pueden ser saturados o insaturados. Los grupos alquilo adecuados incluyen, pero no se limitan a decilo (C<sub>10</sub>), laurilo (C<sub>12</sub>), miristilo (C<sub>14</sub>), palmitilo (C<sub>16</sub>), estearilo (C<sub>18</sub>) e icosilo (C<sub>20</sub>). En realizaciones preferidas, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son iguales, es decir, R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos miristilo (es decir, dimiristilo), R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son ambos estearilos (es decir, diestearilo), etc.

En la fórmula V anterior, el PEG tiene un peso molecular medio en el intervalo de aproximadamente 550 daltons a aproximadamente 10.000 daltons. En algunos casos, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 5.000 daltons (p. ej., de aproximadamente 1.000 daltons a aproximadamente 5.000 daltons, de aproximadamente 1.500 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 3.000 daltons, de aproximadamente 750 daltons a aproximadamente 2.000 daltons, etc.). En realizaciones preferidas, el PEG tiene un peso molecular medio de aproximadamente 2.000 daltons o aproximadamente 750 daltons. El PEG puede estar opcionalmente sustituido con grupos alquilo, alcoxi, acilo o arilo. En ciertas realizaciones, el grupo hidroxilo terminal está sustituido con un grupo metoxi o metilo.

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

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



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

Preferiblemente, el conjugado de PEG-DAA es un conjugado de PEG-dideciloxypropilo (C<sub>10</sub>), conjugado de PEG-dilauriloxypropilo (C<sub>12</sub>), conjugado de PEG-dimiristiloxypropilo (C<sub>14</sub>), conjugado de PEG-dipalmitiloxypropilo (C<sub>16</sub>) o conjugado de PEG-diesteariloxypropilo (C<sub>18</sub>). En estas realizaciones, el PEG preferiblemente tiene un peso molecular medio de aproximadamente 750 o aproximadamente 2.000 daltons. En una realización particularmente preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG2000-C-DMA, en donde el "2000" indica el peso molecular medio del PEG, la "C" indica un resto conector carbamato, y el "DMA" indica dimiristiloxypropilo. En otra realización particularmente preferida, el conjugado de PEG-lípido comprende PEG750-C-DMA, en donde el "750" indica el peso molecular medio del PEG, la "C" indica un resto conector carbamato, y el "DMA" indica dimiristiloxypropilo. En realizaciones particulares, el grupo hidroxilo terminal del PEG está sustituido con un grupo metilo. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que se pueden usar otros dialquiloxypropilos en los conjugados de PEG-DAA descritos en la presente memoria.

Además de los anterior, será fácilmente evidente para los expertos en la técnica que se pueden usar otros polímeros hidrófilos en lugar de PEG. Los ejemplos de polímeros adecuados que se pueden usar en lugar de PEG incluyen, pero no se limitan a polivinilpirrolidona, polimetiloxazolina, polietiloxazolina, polihidroxipropil-metacrilamida, polimetacrilamida y polidimetilacrilamida, ácido poliláctico, poli(ácido glicólico), y celulosas derivatizadas tales como hidroximetilcelulosa o hidroxietilcelulosa.

Además de los componentes anteriores, las partículas lipídicas (p. ej., LNP) descritas en la presente memoria pueden comprender lípidos de polietilenglicol (PEG) catiónicos o CPL (véase, p. ej., Chen et al., *Bioconj. Chem.*, 11:433-437 (2000); patente de EE.UU. n° 6.852.334; publicación PCT n° WO 00/62813).

Los CPL adecuados incluyen compuestos de fórmula VI:

5 A-W-Y (VI),

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

Con referencia a la fórmula VI, "A" es un resto lipídico tal como un lípido anfipático, un lípido neutro o un lípido hidrófobo que actúa como un anclaje de lípido. Los ejemplos de lípidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, diacilglicerilos, dialquilglicerilos, N-N-dialquilaminos, 1,2-diaciloxi-3-aminopropanos y 1,2-dialquil-3-amino-  
10 propanos.

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

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

Las cargas en los restos policatiónicos se pueden distribuir alrededor de todo el resto de partícula, o alternativamente, pueden ser una concentración discreta de densidad de carga en una zona particular del resto de partícula p. ej., un pico de carga. Si la densidad de carga se distribuye sobre la partícula, la densidad de carga se puede distribuir de manera equitativa o desigual. Todas las variaciones de la distribución de carga del resto policatiónico están abarcadas por la presente descripción.

El lípido "A" y el polímero no inmunógeno "W" se pueden unir por varios métodos y preferiblemente por unión covalente. Se pueden usar métodos conocidos por los expertos en la técnica para la unión covalente de "A" y "W." Los enlaces adecuados incluyen, pero no se limitan a, enlaces amida, amina, carboxilo, carbonato, carbamato, éster e hidrazona. Será evidente para los expertos en la técnica que "A" y "W" deben tener grupos funcionales complementarios para efectuar el enlace. La reacción de estos dos grupos, uno en el lípido y el otro en el polímero, proporcionará el enlace deseado. Por ejemplo, cuando el lípido es un diacilglicerol y el hidroxilo terminal se activa, por ejemplo, con NHS y DCC, para formar un éster activo, y después se hace reaccionar con un polímero que contiene un grupo amino, tal como con una poliamida (véase, p. ej., patentes de EE.UU. n° 6.320.017 y 6.586.559), se formará un enlace amida entre los dos grupos.

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

En algunas realizaciones, el conjugado de lípido (p. ej., PEG-lípido) comprende de aproximadamente 0,1% en moles a aproximadamente 2% en moles, de aproximadamente 0,5% en moles a aproximadamente 2% en moles, de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 2% en moles, de aproximadamente 0,6% en moles a aproximadamente 1,9% en moles, de aproximadamente 0,7% en moles a aproximadamente 1,8% en moles, de aproximadamente 0,8% en moles a aproximadamente 1,7% en moles, de aproximadamente 0,9% en moles a aproximadamente 1,6% en moles, de aproximadamente 0,9% en moles a aproximadamente 1,8% en moles, de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 1,8% en moles, de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 1,7% en moles, de aproximadamente 1,2% en moles a aproximadamente 1,8% en moles, de aproximadamente 1,2% en moles a aproximadamente 1,7% en moles, de aproximadamente 1,3% en moles a aproximadamente 1,6% en moles, o de aproximadamente 1,4% en moles a aproximadamente 1,5% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula.

En otras realizaciones, el conjugado de lípido (p. ej., PEG-lípido) comprende de aproximadamente 0% en moles a aproximadamente 20% en moles, de aproximadamente 0,5% en moles a aproximadamente 20% en moles, de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 20% en moles, de aproximadamente 1,5% en moles a aproximadamente 18% en moles, de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 15% en moles, de aproximadamente 4% en moles a aproximadamente 15% en moles, de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 12% en moles, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 12% en moles, o aproximadamente 2% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula.

En realizaciones adicionales, el conjugado de lípido (p. ej., PEG-lípido) comprende de aproximadamente 4% en moles a aproximadamente 10% en moles, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 10% en moles, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 9% en moles, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 8% en moles, de aproximadamente 6% en moles a aproximadamente 9% en moles, de aproximadamente 6% en moles a aproximadamente 8% en moles, o aproximadamente 5% en moles, 6% en moles, 7% en moles, 8% en moles, 9% en moles, o 10% en moles (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos) de los lípidos totales presentes en la partícula.

Se describen ejemplos, porcentajes y/o intervalos adicionales de conjugados lipídicos adecuados para usar en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, p. ej., en la publicación PCT n° WO 09/127060, y publicación PCT n° WO 2010/006282.

Debe entenderse que el porcentaje del conjugado de lípido (p. ej., PEG-lípido) presente en las partículas lipídicas descritas en la presente memoria es una cantidad objetivo, y la cantidad real del conjugado de lípido presente en la formulación puede variar, por ejemplo, en  $\pm 2\%$  en moles. Por ejemplo, en la formulación de partículas lipídicas 1:57 (p. ej., LNP), la cantidad objetivo del conjugado de lípido es 1,4% en moles, pero la cantidad real del conjugado de lípido puede ser  $\pm 0,5\%$  en moles,  $\pm 0,4\%$  en moles,  $\pm 0,3\%$  en moles,  $\pm 0,2\%$  en moles,  $\pm 0,1\%$  en moles, o  $\pm 0,05\%$  en moles de esa cantidad objetivo, estando compuesta el resto de la formulación de los otros componentes lipídicos (que suman hasta 100% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula). De forma similar, en la formulación de partículas lipídicas 7:54 (p. ej., LNP), la cantidad objetivo del conjugado de lípido es 6,76% en moles, pero la cantidad real del conjugado de lípido puede ser  $\pm 2\%$  en moles,  $\pm 1,5\%$  en moles,  $\pm 1\%$  en moles,  $\pm 0,75\%$  en moles,  $\pm 0,5\%$  en moles,  $\pm 0,25\%$  en moles, o  $\pm 0,1\%$  en moles de esa cantidad objetivo, estando compuesta el resto de la formulación de los otros componentes lipídicos (que suman hasta 100% en moles de los lípidos totales presentes en la partícula).

Un experto en la técnica apreciará que la concentración del conjugado lipídico puede variar dependiendo del conjugado lipídico usado y la velocidad a la que la partícula lipídica se convierte en fusogénica.

Controlando la composición y la concentración del conjugado de lípido, se puede controlar la velocidad a la que el conjugado de lípido se intercambia fuera de la partícula lipídica y, a su vez, la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica. Por ejemplo, cuando se usa un conjugado de PEG-DAA como el conjugado de lípido, la velocidad a la cual la partícula lipídica se vuelve fusogénica puede variar, por ejemplo, variando la concentración del conjugado de lípido, variando el peso molecular del PEG, o variando la longitud de la cadena y el grado de saturación de los grupos alquilo en el conjugado de PEG-DAA. Además, se puede usar otras variables que incluyen, por ejemplo, pH, temperatura, fuerza iónica, etc. para variar y/o controlar la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica. Otros métodos que se pueden usar para controlar la velocidad a la que la partícula lipídica se vuelve fusogénica se harán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de esta descripción. Además, controlando la composición y la concentración del conjugado lipídico, se puede controlar el tamaño de la partícula lipídica (p. ej., LNP).

#### VI. Preparación de partículas lipídicas

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, p. ej., LNP, en las que un agente activo o agente terapéutico tal como un ARN interferente (p. ej., ARNip) está atrapado dentro de la parte lipídica de la partícula y está protegido de la degradación, se pueden formar por cualquier método conocido en la técnica, que incluye, pero no se limita a un método de mezcla continua, un procedimiento de dilución directa y un procedimiento de dilución en línea.

En realizaciones particulares, los lípidos catiónicos pueden comprender lípidos de fórmula I o sus sales, solos o en combinación con otros lípidos catiónicos. En otras realizaciones, los lípidos no catiónicos son esfingomiélna de huevo (ESM), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), 1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), monometil-fosfatidiletanolamina, dimetil-fosfatidiletanolamina, 14:0 PE (1,2-dimiristoil-fosfatidiletanolamina (DMPE)), 16:0 PE (1,2-dipalmitoil-fosfatidiletanolamina (DPPE)), 18:0 PE (1,2-diestearoil-fosfatidiletanolamina (DSPE)), 18:1 PE (1,2-dioleoil-fosfatidiletanolamina (DOPE)), 18:1 trans PE (1,2-dielaidoil-fosfatidiletanolamina (DEPE)), 18:0-18:1 PE (1-estearoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (SOPE)), 16:0-18:1 PE (1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidiletanolamina (POPE)), polímeros basados en polietilenglicol (p. ej., PEG 2000, PEG 5000, diacilgliceroles modificados con PEG, o dialquiloilpropilos modificados con PEG), colesterol, sus derivados o sus combinaciones.

En ciertas realizaciones, se describen en la presente memoria partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP) producidas por un método de mezcla continua, p. ej., un procedimiento que incluye proporcionar una solución acuosa que comprende un ácido nucleico (p. ej., ARN interferente) en un primer depósito, proporcionar una solución lipídica orgánica en un segundo depósito (en donde los lípidos presentes en la solución lipídica orgánica se solubilizan en un solvente orgánico, p. ej., un alcohol inferior tal como etanol), y mezclar la solución acuosa con la solución lipídica orgánica de modo que la solución lipídica orgánica se mezcle con la solución acuosa para producir sustancialmente de forma instantánea una vesícula lipídica (p. ej., liposoma) que encapsula el ácido nucleico dentro de la vesícula lipídica. Este procedimiento y el aparato para llevar a cabo este procedimiento se describen en detalle en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2004/0142025.

La acción de introducir continuamente soluciones de lípido y tampón en un entorno de mezcla, tal como en una cámara de mezcla, produce una dilución continua de la solución de lípido con la solución tampón, produciendo así una vesícula lipídica sustancialmente de forma instantánea tras la mezcla. Como se usa en la presente memoria, la frase "diluir continuamente una solución de lípido con una solución tampón" (y variaciones) en general significa que la solución de lípido se diluye suficiente rápidamente en un proceso de hidratación con suficiente fuerza para efectuar la generación de vesículas. Mezclando la solución acuosa que comprende un ácido nucleico con la solución de lípido orgánica, la solución de lípido orgánica experimenta una dilución gradual continua en presencia de la solución tampón (es decir, solución acuosa) para producir una partícula de ácido nucleico-lípido.

Las partículas de ácido nucleico-lípido formadas usando el método de mezcla continua tienen típicamente un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, menos aproximadamente 120 nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm u 80 nm, o aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm o 150 nm (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos). Las partículas así formadas no se agregan y opcionalmente se clasifican por tamaños para lograr un tamaño de partículas uniforme.

En otra realización, se describen en la presente memoria partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP) producidas por un procedimiento de dilución directa que incluye la formación de una solución de vesículas lipídicas (p. ej., liposoma) y la introducción inmediata y directa de la solución de vesículas lipídicas en un recipiente de recolección que contiene una cantidad controlada de tampón de dilución. En aspectos preferidos, el recipiente de recogida incluye uno o más elementos configurados para agitar el contenido del recipiente de recogida para facilitar la dilución. En un aspecto, la cantidad de tampón de dilución presente en el recipiente de recogida es sustancialmente igual al volumen de solución de vesículas lipídicas introducido en el mismo. Como un ejemplo no limitante, una solución de vesículas lipídicas en etanol al 45% cuando se introduce en el recipiente de recogida que contiene un volumen igual de tampón de dilución producirá ventajosamente partículas más pequeñas.

En otra realización más, se describen en la presente memoria partículas de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP) producidas por un procedimiento de dilución en línea en el que un tercer depósito que contiene tampón de dilución se acopla de forma fluida a una segunda región de mezcla. En esta realización, la solución de vesículas lipídicas (p. ej., liposoma) formada en una primera región de mezcla se mezcla inmediatamente y directamente con el tampón de dilución en la segunda región de mezcla. En los aspectos preferidos, la segunda región de mezcla incluye un conector en T dispuesto de modo que la solución de vesículas lipídicas y los flujos del tampón de dilución se encuentran como flujos opuestos 180°; sin embargo, se pueden usar conectores que proporcionan ángulos más pequeños, p. ej., de aproximadamente 27° a aproximadamente 180° (p. ej., aproximadamente 90°). Un mecanismo de bomba suministra un flujo controlable de tampón a la segunda región de mezcla. En un aspecto, el caudal del tampón de dilución proporcionado a la segunda región de mezcla se controla para que sea sustancialmente igual al caudal de la solución de vesículas lipídicas introducida a la misma desde la primera región de mezcla. Esta realización permite ventajosamente un mayor control del flujo del tampón de dilución que se mezcla con la solución de vesículas lipídicas en la segunda región de mezcla, y por lo tanto también de la concentración de la solución de vesículas lipídicas en el tampón durante todo el segundo proceso de mezcla. Dicho control del caudal del tampón de dilución permite ventajosamente la formación de partículas de pequeño tamaño en concentraciones reducidas.

Estos procedimientos y los aparatos para llevar a cabo estos procedimientos de dilución directa y dilución en línea se describen con detalle en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2007/0042031.

Las partículas de ácido nucleico-lípido formadas usando los procedimientos de dilución directa y dilución en línea tienen típicamente un tamaño de aproximadamente 30 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 40 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 50 nm a aproximadamente 150 nm, de aproximadamente 60 nm a aproximadamente 130 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 110 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 90 nm a aproximadamente 100 nm, de aproximadamente 70 a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 80 nm a aproximadamente 90 nm, de aproximadamente 70 nm a aproximadamente 80 nm, menos aproximadamente 120



nm, 110 nm, 100 nm, 90 nm u 80 nm, o aproximadamente 30 nm, 35 nm, 40 nm, 45 nm, 50 nm, 55 nm, 60 nm, 65 nm, 70 nm, 75 nm, 80 nm, 85 nm, 90 nm, 95 nm, 100 nm, 105 nm, 110 nm, 115 nm, 120 nm, 125 nm, 130 nm, 135 nm, 140 nm, 145 nm, o 150 nm (o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos). Las partículas así formadas no se agregan y opcionalmente se clasifican por tamaños para lograr un tamaño de partículas uniforme.

- 5 Si es necesario, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) se puede clasificar por tamaños por cualquiera de los métodos disponibles para la clasificación por tamaños de liposomas. La clasificación por tamaños se puede llevar a cabo con el fin de lograr un intervalo de tamaño deseado y una distribución relativamente estrecha de tamaños de partículas.

10 Hay varias técnicas disponibles para la clasificación por tamaños de las partículas a un tamaño deseado. Un método de clasificación por tamaños, usado para liposomas y que se puede aplicar igualmente a las presentes partículas, se describe en la patente de EE.UU. n° 4.737.323. El tratamiento con ultrasonidos de una suspensión de partículas, ya sea con baño o sonda de ultrasonidos, produce una reducción progresiva del tamaño hasta partículas de menos de aproximadamente 50 nm de tamaño. La homogeneización es otro método que se basa en la energía de cizallamiento para fragmentar partículas más grandes en otras más pequeñas. En un procedimiento de  
15 homogeneización típico, las partículas recirculan a través de un homogeneizador de emulsión estándar hasta que se observan tamaños de partículas seleccionados, típicamente entre aproximadamente 60 y aproximadamente 80 nm. En ambos métodos, la distribución del tamaño de partícula se puede seguir por discriminación de tamaño de partícula de rayo láser convencional, o QELS.

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

25 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos presentes en las partículas se precondensan como se describe, p. ej., en la solicitud de patente de EE.UU. n° 09/744.103.

En otras realizaciones, los métodos pueden comprender además añadir policationes no lipídicos que son útiles para efectuar la lipofección de células usando las presentes composiciones. Los ejemplos de policationes no lipídicos adecuados incluyen bromuro de hexadimetrina (vendido bajo la marca de producto POLYBRENE®, de Aldrich  
30 Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin, EE.UU.) u otras sales de hexadimetrina. Otros policationes adecuados incluyen, por ejemplo, sales de poli-L-ornitina, poli-L-arginina, poli-L-lisina, poli-D-lisina, polialilamina y polietilenimina. La adición de estas sales preferiblemente es después de que se hayan formado las partículas.

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

En otras realizaciones, las relaciones de lípido a ácido nucleico (relaciones en masa/masa) en una partícula formada de ácido nucleico-lípido (p. ej., LNP) formada estarán en el intervalo de aproximadamente 1 (1:1) a  
45 aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 100 (100:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 50 (50:1), de aproximadamente 1 (1:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 2 (2:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 3 (3:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 4 (4:1) a aproximadamente 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente  
50 25 (25:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 20 (20:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 15 (15:1), de aproximadamente 5 (5:1) a aproximadamente 10 (10:1), o aproximadamente 5 (5:1), 6 (6:1), 7 (7:1), 8 (8:1), 9 (9:1), 10 (10:1), 11 (11:1), 12 (12:1), 13 (13:1), 14 (14:1), 15 (15:1), 16 (16:1), 17 (17:1), 18 (18:1), 19 (19:1), 20 (20:1), 21 (21:1), 22 (22:1), 23 (23:1), 24 (24:1), o 25 (25:1), o cualquiera de sus fracciones o intervalo de estos. La relación de los materiales de partida (introducidos) también estará dentro de este intervalo.

Como se ha descrito previamente, el lípido conjugado puede incluir además un CPL. Se describe en la presente  
55 memoria una variedad de métodos generales para hacer LNP-CPL (LNP que contienen CPL). Dos técnicas generales incluyen la técnica de "post-inserción", es decir, la inserción de un CPL, por ejemplo, en una LNP previamente formada, y la técnica "estándar", en donde el CPL se incluye en la mezcla de lípidos durante, por ejemplo, las etapas de formación de la LNP. La técnica de post-inserción da como resultado que las LNP tengan CPL principalmente en la cara externa de la membrana de bicapa de LNP, mientras que las técnicas estándar

proporcionan LNP que tienen CPL en las caras tanto interna como externa. El método es especialmente útil para las vesículas hechas de fosfolípidos (que pueden contener colesterol) y también para las vesículas que contienen PEG-lípidos (tales como PEG-DAA y PEG-DAG). Los métodos para hacer LNP-CPL se enseñan, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 5.705.385; 6.586.410; 5.981.501; 6.534.484; y 6.852.334; publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 2002/0072121; y publicación PCT n° WO 00/62813.

#### VII. Kits

En la presente memoria también se describen partículas lipídicas (p. ej., LNP) en forma de kit. En algunas realizaciones, el kit comprende un recipiente que está compartimentado para contener los diferentes elementos de las partículas lipídicas (p. ej., los agentes activos o agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos y los componentes lipídicos individuales de las partículas). Preferiblemente, el kit comprende un recipiente (p. ej., un vial o ampolla) que contiene las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP), en donde las partículas son producidas por uno de los procedimientos expuestos en la presente memoria. En ciertas realizaciones, el kit puede comprender además un desestabilizador de membrana endosomal (p. ej., iones de calcio). El kit contiene típicamente las composiciones de partículas descritas en la presente memoria, ya sea como una suspensión en un vehículo farmacéuticamente aceptable o en forma deshidratada, con instrucciones para su rehidratación (si está liofilizada) y administración.

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria se pueden adaptar para dirigirse preferentemente a tejidos, órganos o tumores particulares de interés. En algunos casos, la formulación de partículas lipídicas 1:57 (p. ej., LNP) se puede usar para dirigirse preferentemente al hígado (p. ej., tejido del hígado normal). En otros casos, la formulación de partículas lipídicas 7:54 (p. ej., LNP) se puede usar para tratar preferentemente tumores sólidos tales como tumores hepáticos y tumores fuera del hígado. En realizaciones preferidas, los kits descritos en la presente memoria comprenden estas partículas lipídicas dirigidas al hígado y/o al tumor, en donde las partículas están presentes en un recipiente como una suspensión o en forma deshidratada.

En ciertos otros casos, puede ser deseable tener un resto director unido a la superficie de la partícula lipídica para mejorar más el direccionamiento de la partícula. Métodos para unir restos directores (p. ej., anticuerpos, proteínas, etc.) a lípidos (tales como los usados en las presentes partículas) son conocidos por los expertos en la técnica.

#### VIII. Administración de partículas lipídicas

Una vez formadas, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) son útiles para la introducción de agentes activos o agentes terapéuticos (p. ej., ácidos nucleicos tales como ARN interferente) en células. Por consiguiente, se describen en la presente memoria métodos para introducir un agente activo o agente terapéutico, tal como un ácido nucleico (p. ej., ARN interferente) en una célula. En algunos casos, la célula es una célula del hígado, tal como p. ej., un hepatocito presente en el tejido hepático. En otros casos, la célula es una célula tumoral tal como, p. ej., una célula tumoral presente en un tumor sólido. Los métodos se llevan a cabo in vitro o in vivo formando primero las partículas como se ha descrito antes y después poniendo en contacto las partículas con las células durante un período de tiempo suficiente para que se produzca el suministro del agente activo o agente terapéutico a las células.

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) se pueden adsorber en casi cualquier tipo de celda con las que se mezclan o se ponen en contacto. Una vez adsorbidas, las partículas pueden ser endocitadas por una parte de las células, intercambiar lípidos con membranas celulares o fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la parte de agente activo o agente terapéutico (p. ej., ácido nucleico) de la partícula puede tener lugar por cualquiera de estas vías. En particular, cuando tiene lugar la fusión, la membrana de la partícula se integra en la membrana celular y los contenidos de la partícula se combinan con el fluido intracelular.

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) se puede administrar solas o en una mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución salina fisiológica o tampón de fosfato) seleccionado de acuerdo con la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional. En general, se usará la solución salina tamponada normal (p. ej., NaCl 135-150 mM) como el vehículo farmacéuticamente aceptable. Otros vehículos adecuados incluyen, p. ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares, incluyendo glicoproteínas para mejorar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. Los vehículos adecuados adicionales se describen, p. ej., en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17<sup>a</sup> ed. (1985). Como se usa en la presente memoria, "vehículo" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones de vehículos, suspensiones, coloides y similares. La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un ser humano.

El vehículo farmacéuticamente aceptable en general se añade después de la formación de las partículas lipídicas. Por lo tanto, después de que se forme la partícula lipídica (p. ej., LNP), la partícula se puede diluir en vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como solución salina tamponada normal.

La concentración de partículas en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente 0,05%, en general a o al menos de aproximadamente de 2 al 5%, hasta tanto como de aproximadamente 10 a 90% en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluidos, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración se puede aumentar para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardíaca congestiva asociada a aterosclerosis o hipertensión grave. Alternativamente, las partículas compuestas de lípidos irritantes se pueden diluir a bajas concentraciones para disminuir la inflamación en el sitio de administración.

Las composiciones farmacéuticas descritas en la presente memoria se pueden esterilizar por técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las soluciones acuosas se pueden envasar para usar o filtrar en condiciones asépticas y liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico y cloruro cálcico. Además, la suspensión de partículas puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen los lípidos contra daños por radicales libres y peroxidativos de lípidos en el almacenamiento. Son adecuados los inactivadores de los radicales libres lipófilos, tales como el alfatocoferol, y los agentes quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como la ferrioxamina.

En algunas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) son particularmente útiles en métodos para el suministro terapéutico de uno o más ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ARN interferente (p. ej., ARNip). En particular, un objeto de esta descripción es proporcionar métodos *in vitro* e *in vivo* para el tratamiento de una enfermedad o trastorno en un mamífero (p. ej., un roedor tal como un ratón o un primate tal como un ser humano, chimpancé o mono), regulando por disminución o silenciando la transcripción y/o traducción de una o más secuencias de ácidos nucleicos o genes de interés. Como un ejemplo no limitante, los métodos descritos en la presente memoria son útiles para el suministro *in vivo* de ARN interferente (p. ej., ARNip) al hígado y/o tumor de un sujeto mamífero. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno está asociada con la expresión y/o la sobreexpresión de un gen y la expresión o sobreexpresión del gen se reduce mediante el ARN interferente (p. ej., ARNip). En ciertas otras realizaciones, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la partícula lipídica al mamífero. En algunos casos, un ARN interferente (p. ej., ARNip) se formula en una LNP, y las partículas se administran a pacientes que requieren dicho tratamiento. En otros casos, las células se extraen de un paciente, se suministra el ARN interferente *in vitro* (p. ej., usando una LNP descrita en la presente memoria), y las células se vuelven a inyectar en el paciente.

#### A. Administración *in vivo*

El suministro sistémico para el tratamiento *in vivo*, p. ej., el suministro de un ácido nucleico terapéutico a una célula diana distal a través de sistemas corporales tales como la circulación, se ha logrado usando partículas de ácido nucleico-lípido tales como las descritas en las publicaciones PCT n° WO 05/007196, WO 05/121348, WO 05/120152 y WO 04/002453. También se describen en la presente memoria partículas lipídicas completamente encapsuladas que protegen el ácido nucleico de la degradación por nucleasas en el suero, no son inmunógenas, son de tamaño pequeño y son adecuadas para dosis repetidas.

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

En realizaciones donde las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) se administran por vía intravenosa, al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20% o 25% de la dosis total inyectada de las partículas está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En otras realizaciones, más de aproximadamente 20%, 30%, 40% y tanto como aproximadamente 60%, 70% u 80% de la dosis total inyectada de las partículas lipídicas está presente en el plasma aproximadamente 8, 12, 24, 36 o 48 horas después de la inyección. En ciertos casos, más de aproximadamente 10% de una pluralidad de partículas está presente en el plasma de un mamífero aproximadamente 1 hora después de la administración. En ciertos otros casos, la presencia de las partículas lipídicas es detectable al menos aproximadamente 1 hora después de la administración de la partícula. En ciertas realizaciones, la presencia de un agente terapéutico tal como un ácido

nucleico es detectable en células del pulmón, hígado, tumor o en un sitio de inflamación aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras realizaciones, la regulación por disminución de la expresión de una secuencia diana por un ARN interferente (p. ej., ARNip) es detectable aproximadamente 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72 o 96 horas después de la administración. En otras realizaciones más, la regulación por disminución de la expresión de una secuencia diana por un ARN interferente (p. ej., ARNip) se produce preferentemente en las células del hígado (p. ej., hepatocitos), células tumorales o en células en un sitio de inflamación. En realizaciones adicionales, la presencia o efecto de un ARN interferente (p. ej., ARNip) en células en un sitio proximal o distal al sitio de administración o en células del pulmón, hígado o un tumor es detectable aproximadamente 12, 24, 48, 72 o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 26 o 28 días después de la administración. En realizaciones adicionales, las partículas lipídicas (p. ej., LNP) descritas en la presente memoria se administran por vía parenteral o intraperitoneal.

Las composiciones descritas en la presente memoria, ya sea solas o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden hacer en formulaciones en aerosol (es decir, se pueden "nebulizar") para ser administradas por inhalación (p. ej., vía intranasal o intratraqueal) (véase, Brigham et al., *Am. J. Sci.*, 298: 278 (1989)). Las formulaciones en aerosol se pueden poner en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar por pulverizaciones intranasales, inhalación y/u otros vehículos de suministro de aerosol. Se han descrito métodos para suministrar composiciones de ácido nucleico directamente a los pulmones mediante pulverizadores de aerosoles nasales, p. ej., en las patentes de EE.UU. n° 5.756.353 y 5.804.212. De este modo, el suministro de fármacos usando resinas de micropartículas intranasales y compuestos de lisofosfatidilglicerol (patente de EE.UU. 5.725.871) también es bien conocido en la técnica farmacéutica. De manera similar, el suministro de fármaco transmucosa en forma de una matriz de soporte de politetrafluoroetileno se describe en la patente de EE.UU. n° 5.780.045.

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

En general, cuando se administran por vía intravenosa, las formulaciones de partículas lipídicas se formulan con un vehículo farmacéutico adecuado. Se pueden usar muchos vehículos farmacéuticamente aceptables en las composiciones y métodos descritos en la presente memoria. Las formulaciones adecuadas para usar en la presente memoria se encuentran, por ejemplo, en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17<sup>a</sup> ed. (1985). Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% y similares, y pueden incluir glicoproteínas para mejorar la estabilidad, tales como albúmina, lipoproteína, globulina, etc. En general, se usará solución salina tamponada normal (NaCl 135-150 mM) como vehículo farmacéuticamente aceptable, pero serán suficientes otros vehículos adecuados. Estas composiciones se pueden esterilizar por técnicas de esterilización liposomal convencionales, tales como filtración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y de tamponamiento, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc. Estas composiciones se pueden esterilizar usando las técnicas mencionadas antes o, alternativamente, se pueden producir en condiciones estériles. Las soluciones acuosas resultantes se pueden envasar para usar o filtrar en condiciones asépticas y liofilizar, combinándose la preparación liofilizada con una solución acuosa estéril antes de la administración.

En ciertas aplicaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria se pueden administrar por vía oral al individuo. Las partículas se pueden incorporar con excipientes y usar en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas para chupar, cápsulas, píldoras, pastillas, elixires, colutorios, suspensiones, aerosoles orales, jarabes, obleas y similares (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 5.641.515, 5.580.579 y 5.792.451). Estas formas farmacéuticas orales también pueden contener lo siguiente: aglutinantes, gelatina; excipientes, lubricantes y/o agentes aromatizantes. Cuando la forma farmacéutica unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales descritos antes, un vehículo líquido. Pueden estar presentes varios otros materiales como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por supuesto, cualquier material usado en la preparación de cualquier forma farmacéutica unitaria debe ser farmacéuticamente puro y sustancialmente no tóxico en las cantidades usadas.

Típicamente, estas formulaciones orales pueden contener al menos aproximadamente 0,1% de las partículas lipídicas o más, aunque el porcentaje de las partículas puede variar, por supuesto, y puede estar convenientemente entre aproximadamente 1% o 2% y aproximadamente 60% o 70% o más del peso o volumen de la formulación total. Naturalmente, la cantidad de partículas en cada composición terapéuticamente útil se puede preparar de modo que

se obtenga una dosis adecuada en cualquier dosis unitaria dada del compuesto. El experto en la técnica de preparación de dichas formulaciones farmacéuticas contemplará factores tales como la solubilidad, biodisponibilidad, semivida biológica, vía de administración, vida en anaquel del producto, así como otras consideraciones farmacológicas, y como tal, pueden ser deseables una variedad de dosis y regímenes de tratamiento.

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

En otro ejemplo de su uso, las partículas lipídicas se pueden incorporar en una amplia variedad de formas farmacéuticas tópicas. Por ejemplo, una suspensión que contiene partículas de ácido nucleico-lípido tales como LNP se puede formular y administrar como geles, aceites, emulsiones, cremas tópicas, pastas, pomadas, lociones, espumas, mousses y similares.

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

- 25 Los métodos descritos en la presente memoria se pueden practicar en una variedad de hospedantes. Los hospedantes preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como primates (p. ej., seres humanos y chimpancés, así como otros primates no humanos), caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (p. ej., ratas y ratones), lagomorfos y porcinos.

La cantidad de partículas administradas dependerá de la relación de agente terapéutico (p. ej., ácido nucleico) a lípidos, el agente terapéutico particular (p. ej., ácido nucleico) usado, la enfermedad o trastorno que se trata, la edad, peso y estado del paciente, y el criterio del médico, pero en general estará entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente  $10^8$ - $10^{10}$  partículas por administración (p. ej., inyección).

### 35 B. Administración in vitro

Para aplicaciones in vitro, el suministro de agentes terapéuticos tales como ácidos nucleicos (p. ej., ARN interferente) puede ser a cualquier célula desarrollada en cultivo, sea de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. En realizaciones preferidas, las células son células animales, más preferiblemente células de mamífero, y lo más preferiblemente células humanas (p. ej., células tumorales o hepatocitos).

El contacto entre las células y las partículas lipídicas, cuando se lleva a cabo in vitro, tiene lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de partículas varía ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero en general es entre aproximadamente  $1 \mu\text{mol}$  y aproximadamente  $10 \text{ mmol}$ . El tratamiento de las células con las partículas lipídicas se lleva a cabo en general a temperaturas fisiológicas (aproximadamente  $37^\circ\text{C}$ ) durante períodos de tiempo de aproximadamente 1 a 48 horas, preferiblemente de aproximadamente 2 a 4 horas.

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

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

Usando un ensayo de parámetros de liberación endosomal (ERP), se puede optimizar la eficacia del suministro de la LNP u otra partícula lipídica descrita en la presente memoria. Se describe en detalle un ensayo de ERP en la

publicación de solicitud de patente de EE.UU. nº 2003/0077829. Más en particular, el propósito de un ensayo ERP es distinguir el efecto de varios lípidos catiónicos y componentes lipídicos auxiliares de la LNP u otra partícula lipídica basándose en su efecto relativo sobre la unión/absorción o fusión con/desestabilización de la membrana endosomal. Este ensayo permite determinar cuantitativamente cómo afecta cada componente de la LNP u otra partícula lipídica a la eficiencia del suministro, optimizando así la LNP u otra partícula lipídica. Normalmente, un ensayo ERP mide la expresión de una proteína indicadora (p. ej., luciferasa,  $\beta$ -galactosidasa, proteína verde fluorescente (GFP), etc.), y en algunos casos, una formulación de LNP optimizada para un plásmido de expresión también será adecuada para encapsular un ARN interferente. En otros casos, un ensayo de ERP se puede adaptar para medir la regulación por disminución de la transcripción o traducción de una secuencia diana en presencia o ausencia de un ARN interferente (p. ej., ARNip). Comparando los ERP para cada una de las diferentes LNP u otras partículas lipídicas, se puede determinar fácilmente el sistema optimizado, p. ej., la LNP u otra partícula lipídica que tenga la mayor absorción en la célula.

#### C. Células para suministro de partículas lipídicas

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se usar para tratar una amplia variedad de tipos de células, in vivo e in vitro. Las células adecuadas incluyen, pero no se limitan a hepatocitos, células reticuloendoteliales (p. ej., monocitos, macrófagos, etc.), células de fibroblastos, células endoteliales, células de plaquetas, otros tipos de células infectadas y/o susceptibles de ser infectadas con virus, células precursoras hematopoyéticas (citoblastos), queratinocitos, células musculares lisas y esqueléticas, osteoblastos, neuronas, linfocitos quiescentes, células diferenciadas terminalmente, células primarias lentas o sin ciclo, células parenquimatosas, células linfoides, células epiteliales, células óseas y similares.

En realizaciones particulares, un agente activo o agente terapéutico tal como un ácido nucleico (p. ej., un ARN interferente) se suministra a las células de cáncer (p. ej., células de un tumor sólido) que incluyen, entre otras, células de cáncer de hígado, células de cáncer de pulmón, células de cáncer de colon, células de cáncer rectal, células de cáncer de ano, células de cáncer de conducto biliar, células de cáncer de intestino delgado, células de cáncer de estómago (gástricas), células de cáncer esofágico, células de cáncer de vesícula biliar, células de cáncer pancreático, células de cáncer de apéndice, células de cáncer de mama, células de cáncer de ovario, células de cáncer de cuello uterino, células de cáncer de próstata, células de cáncer renal, células de cáncer del sistema nervioso central, células tumorales de glioblastoma, células de cáncer de piel, células de linfoma, células tumorales de coriocarcinoma, células de cáncer de cabeza y cuello, células tumorales de sarcoma osteogénico y células de cáncer de la sangre.

El suministro in vivo de partículas lipídicas, tales como LNP que encapsulan un ácido nucleico (p. ej., un ARN interferente) es adecuado para dirigir células de cualquier tipo de célula. Los métodos y composiciones se pueden usar con células de una amplia variedad de vertebrados, que incluyen mamíferos, tales como, p. ej., caninos, felinos, equinos, bovinos, ovinos, caprinos, roedores (p. ej., ratones, ratas y cobayas), lagomorfos, cerdos y primates (p. ej. monos, chimpancés, y humanos).

#### D. Detección de partículas lipídicas

En algunas realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) son detectables en el sujeto aproximadamente a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más horas. En otras realizaciones, las partículas lipídicas descritas en la presente memoria (p. ej., LNP) son detectables en el sujeto aproximadamente a las 8, 12, 24, 48, 60, 72 o 96 horas, o aproximadamente 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 22, 24, 25, o 28 días después de la administración de las partículas. La presencia de las partículas se puede detectar en las células, tejidos u otras muestras biológicas del sujeto. Las partículas pueden ser detectadas, p. ej., por detección directa de las partículas, detección de un ácido nucleico terapéutico tal como una secuencia de ARN interferente (p. ej., ARNip), detección de la secuencia diana de interés (es decir, detectando la expresión o expresión reducida de la secuencia de interés), o una de sus combinaciones.

##### 1. Detección de partículas

Las partículas lipídicas descritas en la presente memoria, tales como LNP, se pueden detectar usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede acoplar un marcador directa o indirectamente a un componente de la partícula lipídica usando métodos bien conocidos en la técnica. Se puede usar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el componente de partícula lipídica, los requisitos de estabilidad y la instrumentación disponible y posibilidad de eliminación. Los marcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a marcadores espectrales tales como colorantes fluorescentes (p. ej., fluoresceína y derivados, como el isotiocianato de fluoresceína (FITC) y Oregon Green™; rodamina y derivados como el rojo de Texas, isotiocianato de tetraodimina (TRITC), etc., digoxigenina, biotina, ficoeritrina, AMCA, CyDyes™ y similares; radiomarcadores tales como  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ , etc.; enzimas tales como la peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.; marcadores colorimétricos espectrales tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico tales como poliestireno, polipropileno, látex, etc. El marcador se puede detectar usando cualquier medio conocido en la técnica.

## 2. Detección de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos (p. ej., ARN interferente) se detectan y cuantifican en la presente memoria por cualquiera de una serie de medios bien conocidos por los expertos en la técnica. La detección de ácidos nucleicos se puede llevar a cabo por métodos bien conocidos tales como el análisis Southern, análisis Northern, electroforesis en gel, PCR, radiomarcado, recuento de centelleo y cromatografía de afinidad. También se pueden usar métodos bioquímicos analíticos adicionales, tales como espectrofotometría, radiografía, electroforesis, electroforesis capilar, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de capa fina (TLC) y cromatografía de hiperdifusión.

La selección de un formato de hibridación de ácido nucleico no es crítica. Los expertos en la técnica conocen una variedad de formatos de hibridación de ácidos nucleicos. Por ejemplo, los formatos comunes incluyen ensayos tipo sándwich y ensayos de competencia o desplazamiento. Las técnicas de hibridación se describen en general, p. ej., en "Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach," Eds. Hames and Higgins, IRL Press (1985).

La sensibilidad de los ensayos de hibridación se puede mejorar mediante el uso de un sistema de amplificación de ácido nucleico que multiplica el ácido nucleico diana que se está detectando. Se conocen técnicas de amplificación in vitro adecuadas para amplificar secuencias para usar como sondas moleculares o para generar fragmentos de ácido nucleico para su posterior subclonación. Los ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos en la técnica por dichos métodos de amplificación in vitro, incluyendo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la ligasa (LCR), amplificación de la Q $\beta$ -replicasa y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (p. ej., NASBA™) se encuentran en Sambrook et al., en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2000); y Ausubel et al., *SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc. (2002); así como la patente de EE.UU. n° 4.683.202; PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications (Innis et al. eds.) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990); Arnheim y Levinson (1 de octubre de 1990), C&EN 36; *The Journal Of NIH Research*, 3:81 (1991); Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:1173 (1989); Guatelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990); Lomell et al., *J. Clin. Chem.*, 35:1826 (1989); Landegren et al., *Science*, 241:1077 (1988); Van Brunt, *Biotechnology*, 8:291 (1990); Wu y Wallace, *Gene*, 4:560 (1989); Barringer et al., *Gene*, 89:117 (1990); y Sooknanan y Malek, *Biotechnology*, 13:563 (1995). Se describen métodos mejorados de clonación en ácidos nucleicos amplificados in vitro en la patente de EE.UU. n° 5.426.039. Otros métodos descritos en la técnica son la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA™, Cangene, Mississauga, Ontario) y los sistemas de la Q $\beta$ -replicasa. Estos sistemas se pueden usar para identificar directamente mutantes donde los cebadores de la PCR o LCR están diseñados para extenderse o ligarse solo cuando está presente una secuencia seleccionada. Alternativamente, las secuencias seleccionadas se pueden amplificar en general usando, por ejemplo, cebadores de PCR no específicos y la región diana amplificada después se puede examinar para determinar una secuencia específica indicativa de una mutación.

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

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

## IX. Ejemplos

La presente invención se describirá con mayor detalle mediante ejemplos específicos. Los siguientes ejemplos se ofrecen con fines ilustrativos y no pretenden limitar la invención de ninguna manera. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se pueden cambiar o modificar para dar esencialmente los mismos resultados.

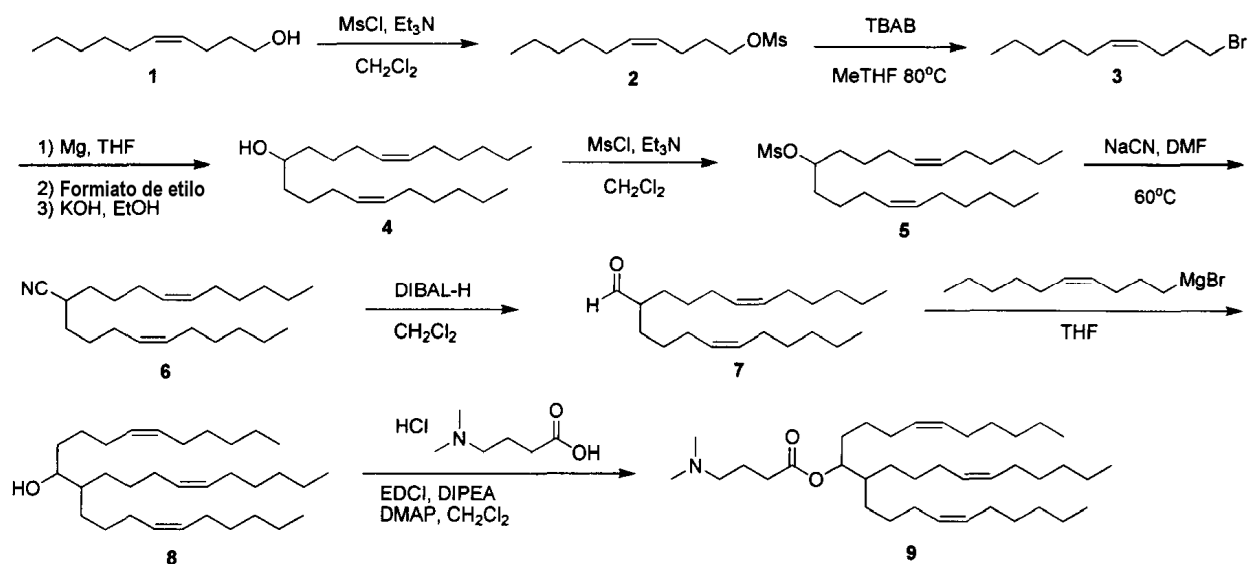
Métodos generales: Todas las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente bajo una presión positiva de nitrógeno, a menos que se indique lo contrario. Todos los reactivos se adquirieron de fuentes comerciales y se usaron sin purificación adicional. El avance de las reacciones se vigiló por TLC en gel de sílice 60 F254 (0,25 mm, E. Merck). Las manchas se detectaron con luz UV o por carbonización con tinciones de anisaldehído o sulfato de cobre. Toda la cromatografía en columna se llevó a cabo en gel de sílice 60 (40-60  $\mu$ M). La relación entre el gel de

sílice y el producto bruto variaba entre 100 y 50:1. Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se registraron a 300 MHz o 400 MHz y los desplazamientos químicos se daban respecto a una referencia interna del disolvente protonado residual (7,27 ppm de  $\text{CHCl}_3$ ). Las soluciones orgánicas se concentraron a vacío a  $<40^\circ\text{C}$ .

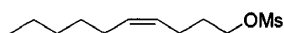
## Ejemplo 1

- 5 Este ejemplo describe la síntesis de lípidos catiónicos, trialquílicos, de ejemplo, descritos en la presente memoria.

## Esquema sintético para el compuesto 9

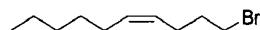


## Síntesis del compuesto 2



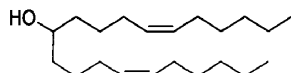
- 10 A una solución enfriada ( $0^\circ\text{C}$ ) de (Z)-dec-4-en-1-ol **9** (20 g, 128,0 mmol) y trietilamina (26,7 ml, 191,9 mmol) en diclorometano anhidro (200 ml) se añadió lentamente cloruro de metanosulfonilo (14,9 ml, 191,9 mmol). La solución se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se diluyó con diclorometano (100 ml). La solución se lavó con bicarbonato sódico saturado (3 x 150 ml) y después los lavados acuosos combinados se extrajeron con diclorometano (150 ml). Los extractos de diclorometano combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo se filtró a través de una almohadilla de sílice (diclorometano al 100%) para proporcionar el metanosulfonato de (Z)-dec-4-enilo **2** en forma de un aceite amarillo (28,5 g, 95%). Rf 0,5 (100% de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

## Síntesis del Compuesto 3



- 20 A una solución de metanosulfonato de (Z)-dec-4-enilo **2** (28,5 g, 121,1 mmol) en 2-metiltetrahidrofurano (280 ml) se añadió bromuro de tetrabutilamonio (48,8 g, 151,4 mmol). La solución se agitó a  $80^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en atmósfera de nitrógeno, después se diluyó con éter (150 ml) y se lavó con agua (75 ml) y salmuera (75 ml). La solución de éter se secó sobre sulfato de magnesio, se filtró y se concentró a vacío hasta sequedad. El aceite amarillo pálido se filtró a través de una almohadilla de sílice (100% de hexanos) para proporcionar el (Z)-1-bromodec-4-eno **3** en forma de un aceite incoloro (23,0 g, 87%). Rf 0,9 (EtOAc-hexanos al 10%).

## Síntesis del Compuesto 4

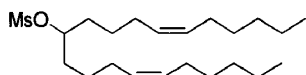


- 30 A una suspensión de virutas de magnesio (1,4 g, 55,1 mmol) en THF anhidro (6 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió lentamente una solución del (Z)-1-bromodec-4-eno **3** (11,5 g, 52,5 mmol) en THF (12 ml). La mezcla de reacción se agitó a  $45^\circ\text{C}$  durante 30 minutos en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a  $0^\circ\text{C}$  y se añadió gota a gota una solución de formiato de etilo (4,1 g, 55,1 mmol) en THF (12 ml) a lo largo de 5 minutos. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas, después se enfrió a  $-15^\circ\text{C}$  y se inactivó lentamente con agua (10 ml) seguido de ácido clorhídrico 5 M (15 ml). Una vez que el magnesio se había disuelto completamente, la solución se



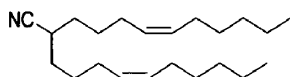
diluyó con agua (50 ml) y se extrajo con hexanos (3 x 75 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo obtenido se disolvió en etanol (40 ml) y se añadió una solución de hidróxido potásico (4,4 g, 78,7 mmol) en agua (10 ml). La mezcla de reacción se agitó enérgicamente durante 30 minutos y después se concentró a vacío para eliminar el etanol. Después la solución se acidificó con ácido clorhídrico 5 M (15 ml) y se extrajo con hexanos (3 x 75 ml). Los extractos de hexanos combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El producto bruto se purificó por cromatografía en columna (de 100% de hexanos a acetato de etilo en hexanos al 2,5%) para proporcionar el (6Z,15Z)-hencosa-6,15-dien-11-ol **4** en forma de un aceite amarillo pálido (5,6 g, 35%). Rf 0,4 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### 10 Síntesis del Compuesto 5



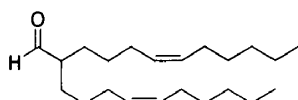
A una solución enfriada (0°C) de 6Z,15Z)-hencosa-6,15-dien-11-ol **4** (5,6 g, 18,2 mmol) y trietilamina (3,8 ml, 27,2 mmol) en diclorometano anhidro (50 ml) se añadió lentamente cloruro de metanosulfonilo (2,1 ml, 27,2 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y después se diluyó con diclorometano (50 ml). La solución se lavó con solución saturada de bicarbonato sódico (3 x 25 ml) y después los lavados acuosos combinados se extrajeron con diclorometano (50 ml). Los extractos de diclorometano combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El aceite de color amarillo pálido se filtró a través de una capa de sílice (100% de DCM) para proporcionar el metanosulfonato de (6Z,15Z)-hencosa-6,15-dien-11-ilo **5** en forma de un aceite bruto incoloro (7,6 g). Rf 0,8 (100% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### 20 Síntesis del Compuesto 6



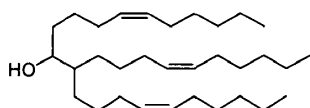
Una solución del metanosulfonato de (6Z,15Z)-hencosa-6,15-dien-11-ilo **5** (7,6 g, 19,6 mmol) y cianuro sódico (4,8 g, 98,1 mmol) en DMF anhidro (60 ml) se calentó a 60°C durante la noche. Tras completarse, la mezcla de reacción se vertió en agua (200 ml) y se extrajo con acetato de etilo (3 x 100 ml). Los extractos de acetato de etilo combinados se lavaron con salmuera (3 x 100 ml), se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El producto se purificó por cromatografía en columna (100% de hexanos a acetato de etilo en hexanos al 1%) para proporcionar el (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enonitrilo **6** en forma de un aceite incoloro (6,6 g, 97%). Rf 0,75 (EtOAc-hexanos al 10%).

#### 30 Síntesis del Compuesto 7



A una solución enfriada (-78°C) de (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enonitrilo **6** (4,0 g, 12,6 mmol) en diclorometano anhidro (125 ml) se añadió lentamente una solución de hidruro de diisobutilaluminio 1 M en hexanos (5,6 ml, 31,5 mmol). La solución se calentó a -15°C y se agitó durante 1 hora. Una vez completada, la reacción se inactivó con ácido clorhídrico al 5% (30 ml) y se agitó a -15°C hasta que cesó la evolución de hidrógeno gaseoso. Después la solución se diluyó con diclorometano (75 ml) y la capa orgánica se lavó con ácido clorhídrico 5 M (100 ml). Los extractos de diclorometano se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (100% de hexanos a acetato de etilo en hexanos al 2%) para proporcionar el (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enal **7** en forma de un aceite incoloro (3,9 g, 97%). Rf 0,65 (AcOEt-Hexanos al 5%).

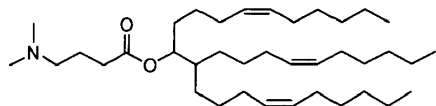
#### 40 Síntesis del compuesto 8



A una suspensión de virutas de magnesio (0,6 g, 23,9 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml) se añadió lentamente una solución de (Z)-1-bromodec-4-eno **3** (4,5 g, 20,5 mmol) en tetrahidrofurano (5 ml). La mezcla de reacción se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se añadió una solución de (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enal **7** en tetrahidrofurano (5 ml). La solución se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se vertió en ácido clorhídrico al 5% (50 ml) y hielo (100 ml). La solución se extrajo con éter (2 x 150 ml). Los extractos de éter combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo

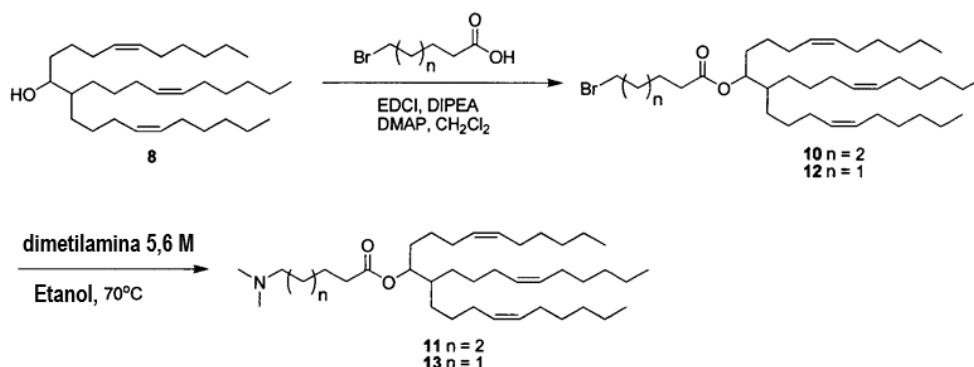
se purificó por cromatografía en columna (acetato de etilo en hexanos al 1%) para proporcionar el (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** en forma de un aceite incoloro (4,8 g, 76%). Rf 0,45 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del compuesto 9

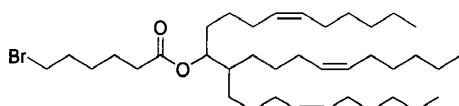


- 5 A una solución del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (0,4 g, 0,9 mmol), hidrocloreto del ácido 4-(dimetilamino)butanoico (0,2 g, 1,3 mmol), hidrocloreto de EDCI (0,25 g, 1,3 mmol), diisopropiletilamina (0,4 ml, 2,6 mmol) en diclorometano anhidro (10 ml) se añadió dimetilaminopiridina (5 mg). La solución se calentó a reflujo durante 2 horas y después se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se concentra a vacío hasta sequedad y se purifica por cromatografía en columna (100% de acetato de etilo) para proporcionar el 4-(dimetilamino)butanoato de 6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **9** en forma de un aceite amarillo pálido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,36 (m, 6H), 4,93 (m, 1H), 2,30 (m, 4H), 2,22 (s, 6H), 2,03 (m, 12H), 1,88 (m, 2H), 1,66-1,18 (m, 31H), 0,90 (m, 9H). Rf 0,3 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

#### Esquema sintético para los compuestos 11 y 13

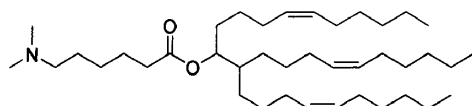


#### 15 Síntesis del Compuesto 10



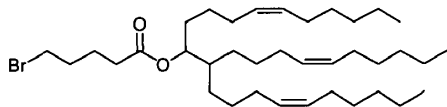
- 20 A una solución del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (2,4 g, 5,2 mmol), ácido 6-bromohexanoico (1,5 g, 7,8 mmol), hidrocloreto de EDCI (1,5 g, 7,8 mmol), diisopropiletilamina (2,0 g, 15,6 mmol) en diclorometano anhidro (25 ml) se añadió dimetilaminopiridina (15 mg). La solución se calentó a reflujo durante 2 horas, se enfrió a temperatura ambiente y se concentró a vacío hasta sequedad. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice 60 (5,1 cm A X 25,4 cm L; eluida con EtOAc/Hex al 5%) para proporcionar el 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10** en forma de un aceite incoloro (3,1 g, 94%). Rf 0,5 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del compuesto 11



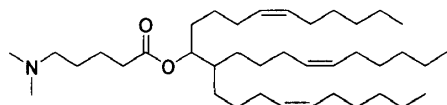
- 25 Al 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10** (3,1 g, 4,9 mmol) en un recipiente a presión sellado con teflón se añadió dimetilamina 5,6 M en etanol (20 ml) y la reacción se calentó a 70°C y se agitó durante la noche. Una vez completada, la reacción se concentró a vacío hasta sequedad. El residuo se disolvió en acetato de etilo (100 ml) y se lavó con una solución de bicarbonato sódico (2 x 50 ml). La capa de acetato de etilo se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró a vacío hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (100% de EtOAc) para proporcionar el 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11** en forma de un aceite amarillo pálido (2,0 g, 69%), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,36 (m, 6H), 4,93 (m, 1H), 2,27 (m, 10H), 2,00 (m, 12H), 1,63 (m, 6H), 1,51 (m, 6H), 1,28 (m, 25H), 0,90 (m, 9H). Rf 0,3 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

## Síntesis del compuesto 12



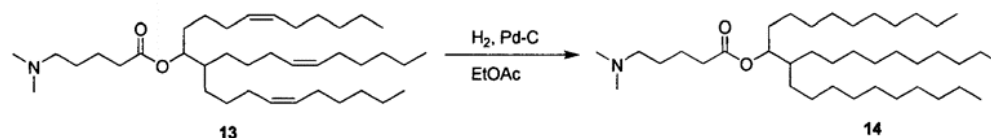
- 5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **12** en forma de un aceite incoloro (3,3 g, 61%) a partir del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (4,0 g, 8,7 mmol), ácido 6-bromo-n-valérico (2,4 g, 13,0 mmol), hidrocloreto de EDCI (2,5 g, 13,0 mmol), diisopropiletilamina (3,4 g, 26,0 mmol) y dimetilaminopiridina (10 mg). Rf 0,5 (AcOEt-Hexanos al 10%).

## Síntesis del compuesto 13

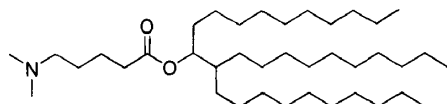


- 10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z, 16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **13** en forma de un aceite amarillo pálido (1,9 g, 62%) a partir de dimetilamina 5,6 M en etanol (20 ml). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,45-5,28 (m, 6H), 4,95-4,90 (m, 1H), 2,34-2,23 (m, 4H), 2,23-2,20 (s, 6H), 2,06-1,92 (m, 12H), 1,70-1,58 (m, 5H), 1,58-1,44 (m, 5H), 1,44-1,15 (m, 25H), 0,92-0,87 (m, 9H). Rf 0,4 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).
- 15

## Esquema sintético para el compuesto 14

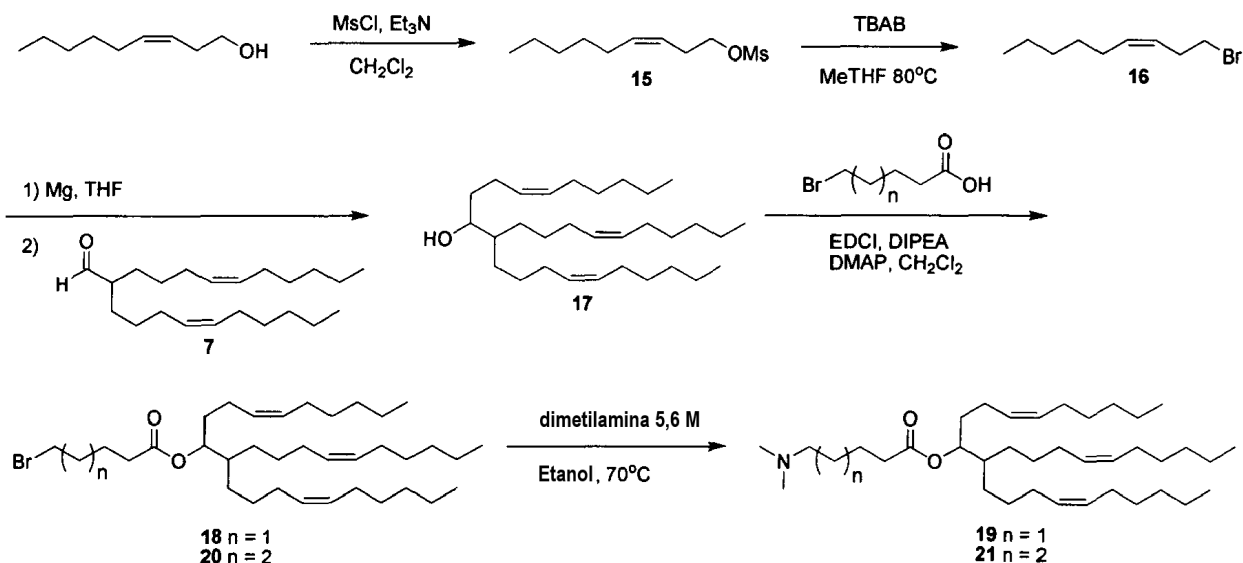


## Síntesis del compuesto 14



- 20 Se extrajo el aire de un matraz que contenía 5-(dimetilamino)pentanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-n-4-en-1-il)tricoso-6,16-dien-11-ilo **13** (200 mg, 0,34 mmol) y se volvió a llenar con nitrógeno (dos veces), después se trató con Pd/C (150 mg, 10% p/p) y posteriormente se suspendió en EtOAc (10 ml). Después se extrajo el aire del matraz de reacción y se volvió a llenar con H<sub>2</sub> (3x) y la mezcla se agitó enérgicamente (18 h). Después se extrajo el H<sub>2</sub> y el matraz se volvió a llenar con N<sub>2</sub>. La mezcla de reacción se filtró a través de Celite, aclarando la torta de filtración con EtOAc, y el filtrado se concentró. El material bruto se sometió a cromatografía (EtOAc) para dar el 5-(dimetilamino)pentanoato de 12-noniltricosan-11-ilo **14** (100 mg, 50%) en forma de un aceite incoloro. Rf 0,35 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub>) 4,95-4,90 (m, 1H), 2,31 (t, 2H), 2,27 (t, 2H), 2,21 (s, 6H), 1,68-1,60 (m, 3H), 1,58-1,42 (m, 5H), 1,38 -1,16 (m, 54H), 0,88 (t, 6H).
- 25

Esquema sintético para los compuestos 19 y 21

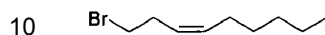


Síntesis del Compuesto 15



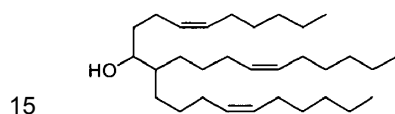
- 5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del metanosulfonato de (Z)-dec-4-enilo **2**, se obtuvo el metanosulfonato de (Z)-non-3-enilo **15** en forma de un aceite amarillo (28,5 g, 92%) a partir del (Z)-non-3-en-1-ol (20,0 g, 128,0 mmol), trietilamina (26,7 ml, 191,9 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (14,9 ml, 191,9 mmol). Rf 0,15 (acetato de etilo-hexanos al 30%).

Síntesis del Compuesto 16



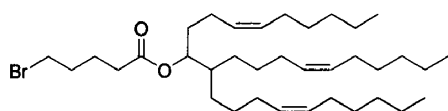
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del (Z)-1-bromodec-4-eno **3**, se obtuvo el (Z)-1-bromonon-3-eno **16** en forma de un aceite incoloro (27,0 g, cuantitativo) a partir del metanosulfonato de (Z)-dec-4-enilo **15** (28,5 g, 129 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (52,0 g, 161,4 mmol). Rf 0,6 (AcOEt-Hexanos al 10%).

Síntesis del compuesto 17



- 20 Un matraz de fondo redondo de 100 ml se cargó con virutas de magnesio (0,6 g, 25,7 mmol) y una barra agitadora. El matraz se secó con una pistola de aire caliente durante 5 minutos. El matraz se cargó con THF (5 ml) y un solo grano en yodo. Se añadió lentamente una solución de (Z)-1-bromonon-3-eno (4,5 g, 22,0 mmol) en THF (5 ml) a la mezcla y la reacción se calentó a reflujo durante 30 minutos en atmósfera de nitrógeno. La solución se enfrió a temperatura ambiente y se añadió una solución de (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enal **7** (4,7 g, 14,7 mmol) en THF (5 ml). La solución se agitó durante la noche a temperatura ambiente y, una vez completada, la mezcla se vertió en HCl al 5% (50 ml) y hielo (100 ml). La solución se extrajo con éter (2 x 150 ml) y los extractos de éter combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (columna: 5,1 cm A x 820,3 cm L; eluida con 100% de hexanos a acetato de etilo en hexanos al 5%) para proporcionar el (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ol **17** en forma de un aceite incoloro (5,4 g, 82%). Rf 0,5 (AcOEt-Hexanos al 10%).

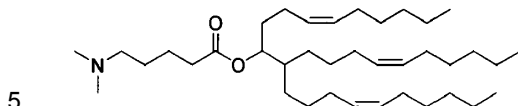
Síntesis del compuesto 18



- 30 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docososa-6,16-dien-11-ilo **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-

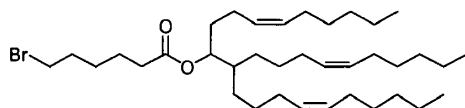
10-ilo **18** en forma de un aceite incoloro (0,9 g, 66%) a partir del (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ol **17** (0,35 g, 0,7 mmol), ácido 5-bromo-n-valérico (0,60 g, 3,4 mmol), EDCI (0,60 g, 3,4 mmol), diisopropiletamina (0,90 g, 6,7 mmol) y DMAP (5 mg, catalizador). Rf 0,5 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del compuesto 19



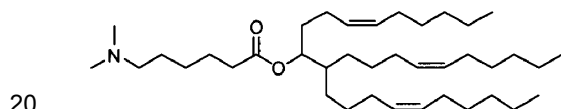
10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ilo **19** en forma de un aceite incoloro (0,2 g, 24%) a partir de dimetilamina 5,6 M en etanol (10 ml) y (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ol **17** (0,35 g, 0,7 mmol). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,40-5,28 (m, 6H), 4,97-4,88 (m, 1H), 2,35-2,24 (m, 4H), 2,24-2,19 (m, 6H), 2,08-1,93 (m, 12H), 1,70-1,55 (m, 3H), 1,55-1,45 (m, 5H), 1,45-1,13 (m, 25H), 0,93-0,82 (m, 9H). Rf 0,4 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 20



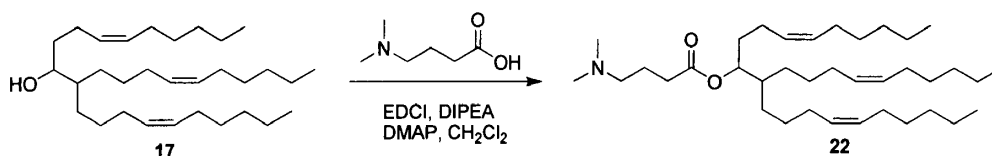
15 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10**, se obtuvo el 6-bromohexanoato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ilo **20** en forma de un aceite incoloro (1,4 g, 99%) a partir del (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ol **17** (0,35 g, 0,7 mmol), ácido 6-bromo-n-caproico (0,70 g, 3,4 mmol), EDCI (0,60 g, 3,4 mmol), diisopropiletamina (0,90 g, 6,7 mmol) y DMAP (5 mg, catalizador). Rf 0,6 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 21

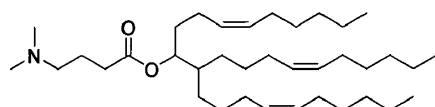


25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11**, se obtuvo el 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ilo **21** en forma de un aceite incoloro (1,2 g, 92%) a partir de dimetilamina 5,6 M en etanol (15 ml). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,44-5,28 (m, 6H), 4,95-4,88 (m, 1H), 2,33-2,19 (m, 10H), 2,08-1,90 (m, 12H), 1,70-1,23 (m, 9H), 1,23-1,14 (m, 26H), 0,93-0,85 (m, 9H). Rf 0,15 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

#### Esquema sintético para el compuesto 22

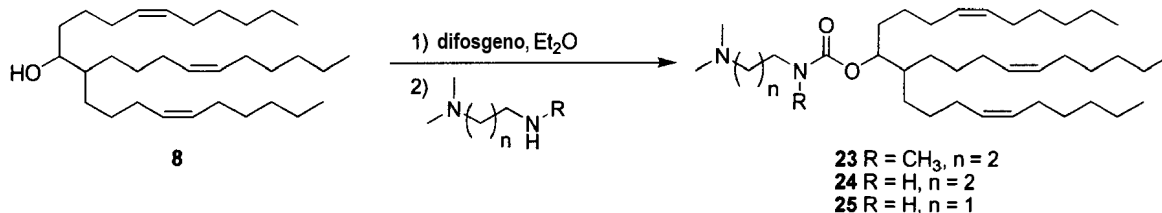


#### Síntesis del Compuesto 22

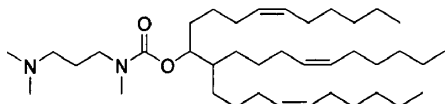


30 A una solución del (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ol **17** (0,5 g, 1,1 mmol), hidrocloreto de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (0,3 g, 1,7 mmol), hidrocloreto de EDCI (0,3 g, 1,7 mmol), DIPEA (0,4 g, 3,4 mmol) en diclorometano anhidro (10 ml) se añadió DMAP (5 mg). La solución se agitó a temperatura ambiente durante la noche en una atmósfera de nitrógeno. La mezcla se concentra a vacío hasta sequedad, después se recogió en DCM (150 ml) y se extrajo con bicarbonato sódico saturado. La mezcla de reacción se purificó por cromatografía en columna sobre gel de sílice 60 (acetato de etilo/hexanos 1:1) para proporcionar el 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-enil)henicososa-6,15-dien-10-ilo **22** en forma de un aceite incoloro (0,4 g, 67%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,40-5,28 (m, 6H), 4,97-4,90 (m, 1H), 2,36-2,25 (m, 4H), 2,25-2,19 (m, 6H), 2,07-1,95 (m, 12H), 1,85-1,73 (m, 2H), 1,58-1,45 (m, 3H), 1,45-1,10 (m, 24H), 0,93-0,85 (m, 9H). Rf 0,4 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

Esquema sintético para los compuestos 23, 24 y 25

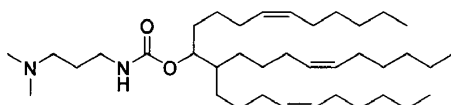


Síntesis del compuesto 23



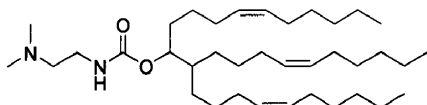
- 5 A una solución del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (0,5 g, 1,1 mmol) en éter dietílico anhidro (10 ml) se añadió lentamente una solución de difosgeno (0,2 ml, 1,8 mmol) en éter dietílico anhidro enfriada a aproximadamente -15°C. La solución se agitó durante 1 hora y después se añadió N,N,N'-trimetil-1,3-propanodiamina (1,3 ml, 8,7 mmol) a -15°C. La solución se calentó a temperatura ambiente, se agitó durante 1 hora y después se filtró para eliminar las sales de amonio y la urea. El filtrado de éter dietílico se concentró a vacío hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (100% de acetato de etilo) para dar el 3-(dimetilamino)propil(metil)carbamato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **23** en forma de un aceite incoloro (0,15 g, 23%), RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,41-5,29 (m, 6H), 4,85-4,77 (m, 1H), 3,35-3,21 (m, 2H), 2,93-2,81 (m, 3H), 2,31-2,17 (m, 8H), 2,08-1,92 (m, 12H), 1,75-1,64 (m, 2H), 1,64-1,15 (m, 31H), 0,92-0,85 (m, 9H). Rf 0,45 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

15 Síntesis del compuesto 24



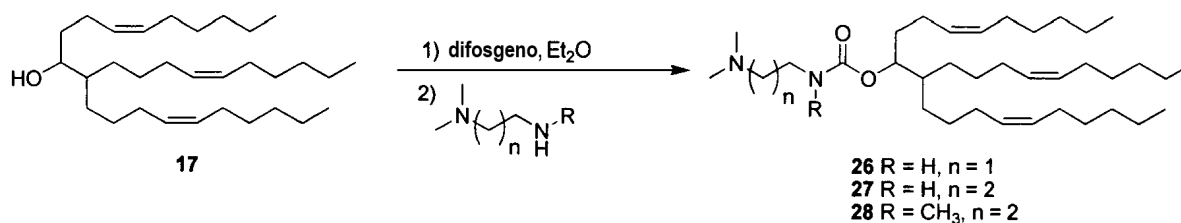
- 20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 3-(dimetilamino)propil(metil)carbamato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **23**, se obtuvo el 3-(dimetilamino)propilcarbamato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **24** en forma de un aceite incoloro (0,1 g, 17%) a partir del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (0,5 g, 1,1 mmol), difosgeno (0,2 ml, 1,8 mmol), piridina y 3-(dimetilamino)-1-propilamina (0,9 g, 8,7 mmol). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,44-5,28 (m, 6H), 4,81-4,72 (s ancho, 1H), 4,55-4,45 (s ancho, 1H), 3,34-3,15 (m, 3H), 2,45-2,13 (m, 7H), 2,10-1,86 (m, 12H), 1,75-1,57 (m, 3H), 1,57-1,03 (m, 30H), 0,93-0,85 (m, 9H). Rf 0,2 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

Síntesis del Compuesto 25

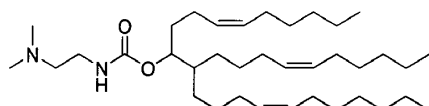


- 25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 3-(dimetilamino)propil(metil)carbamato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **23**, se obtuvo el 2-(dimetilamino)etilcarbamato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **25** en forma de un aceite incoloro (0,20 g, 33%) a partir del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (0,5 g, 1,1 mmol), difosgeno (0,2 ml, 1,8 mmol) y N,N-dimetiletildiamina (0,8 g, 8,7 mmol). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,40-5,28 (m, 6H), 5,08-5,01 (s ancho, 1H), 4,82-4,73 (s ancho, 1H), 3,30-3,18 (m, 2H), 2,44-2,35 (m, 2H), 2,30-2,20 (m, 6H), 2,07-1,91 (m, 12H), 1,65-1,11 (m, 31H), 0,93-0,85 (m, 9H). Rf 0,4 (MeOH-DCM al 10%).

Esquema sintético para los compuestos 26, 27 y 28

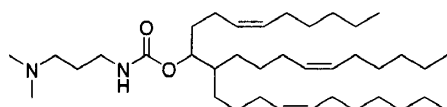


Síntesis del Compuesto 26



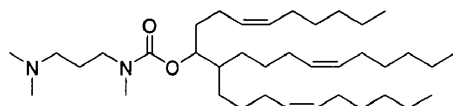
- 5 Una solución del (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,15-dien-10-ol **17** (2,25g, 5,036 mmol) y piridina (611 µl, 7,6 mmol) en Et<sub>2</sub>O anhidro (15 ml), se añadió a una solución enfriada (0°C) de difosgeno (910 µl, 7,6 mmol) en Et<sub>2</sub>O (15 ml). Después de agitar (10 min), la mezcla de reacción se filtró y se concentró para separar el disolvente y el fosgeno gaseoso restante. Una tercera parte de este cloroformiato (0,879 g, 1,679 mmol) se recogió en Et<sub>2</sub>O (5 ml) y se añadió a una solución enfriada (0°C) de N,N-dimetiletilendiamina (367 µl, 3,4 mmol) en Et<sub>2</sub>O anhidro (5 ml).
- 10 Después de agitar (20 min), la mezcla se filtró, se concentró y se sometió a cromatografía (100% de EtOAc) para dar el (2-(dimetilamino)etil)carbamato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,15-dien-10-ilo **26** (603 mg, 64%) en forma de un aceite transparente, incoloro. Rf 0,28 (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub>) 5,45-5,36 (m, 6H), 5,30 (s ancho, 1H), 4,89-4,78 (m, 1H), 3,32-3,21 (m, 2H), 2,42 (t, 2H), 2,25 (s, 6H), 2,16-1,94 (m, 12H), 1,63-1,19 (m, 29H), 0,92 (t, 9H).

15 Síntesis del Compuesto 27



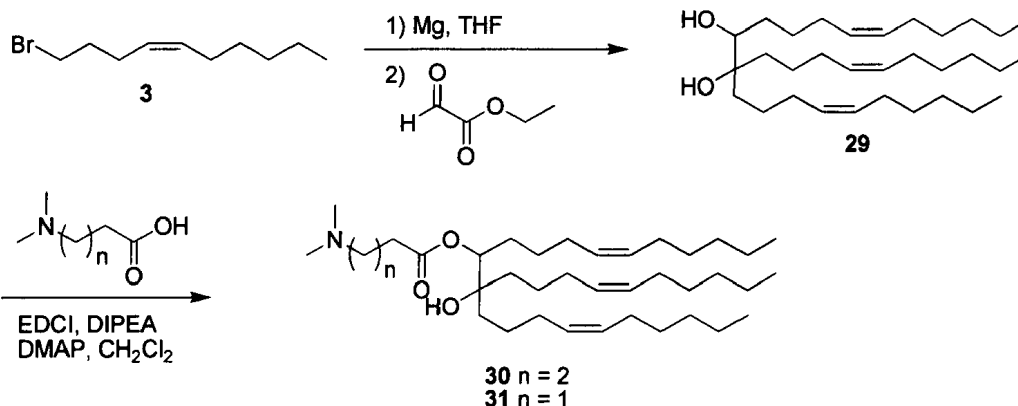
- Una solución enfriada (0°C) del cloroformiato (0,88 g, 1,7 mmol) (como se preparó en la síntesis del (2-(dimetilamino)etil)carbamato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,15-dien-10-ilo **26**) se disolvió en Et<sub>2</sub>O anhidro (5 ml) y se añadió a una solución de N,N-dimetilpropildiamina (422 µl, 3,4 mmol) en Et<sub>2</sub>O anhidro (5 ml).
- 20 Tras completarse (20 min), la solución se filtró, se concentró y después el material bruto se purificó por cromatografía en columna (100% de EtOAc) para dar el (3-(dimetilamino)propil)carbamato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,15-dien-10-ilo **27** (675 mg, 70%) en forma de un aceite transparente, incoloro. Rf 0,32 (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub>) 5,44-5,33 (m, 6H), 4,86-4,78 (m, 1H), 3,32-3,21 (m, 2H), 2,36 (t, 2H), 2,24 (s, 6H), 2,14-1,97 (m, 12H), 1,69 (p ap., 2H), 1,61-1,50 (m, 3H), 1,50-1,20 (m, 27H), 0,91 (t, 9H).

25 Síntesis del Compuesto 28

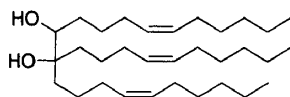


- Una solución enfriada (0°C) del cloroformiato (0,88 g, 1,7 mmol) (como se preparó en la síntesis del (2-(dimetilamino)etil)carbamato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,15-dien-10-ilo **26**) se disolvió en Et<sub>2</sub>O anhidro (5 ml) y se añadió a una solución de N,N,N'-trimetilpropildiamina (492 µl, 3,4 mmol) en Et<sub>2</sub>O anhidro (5 ml).
- 30 Tras completarse (20 min), la solución se filtró, se concentró y después el material bruto se purificó por cromatografía en columna (100% de EtOAc) para dar el (3-(dimetilamino)propil)(metil)carbamato de (6Z,15Z)-11-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,15-dien-10-ilo **28** (672 mg, 68%) en forma de un aceite transparente, incoloro. Rf 0,44 (MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%); RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ<sub>H</sub>) 5,43-5,32 (m, 6H), 4,85 (s ancho, 1H), 3,38-3,27 (m, 2H), 2,95-2,87 (m, 3H), 2,28 (t, 2H), 2,24 (s, 6H), 2,14-1,96 (m, 12H), 1,72 (p ap., 2H), 1,67-1,49 (m, 3H), 1,49-1,20 (m, 26H), 0,91 (t, 9H).
- 35

Esquema sintético para los compuestos 30 y 31

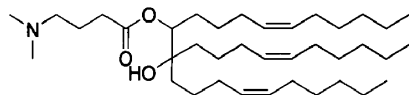


Síntesis del Compuesto 29



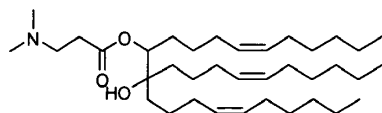
- 5 Un matraz de fondo redondo de 100 ml se cargó con virutas de magnesio (263 mg, 10,9 mmol) y una barra agitadora. El matraz se secó con una pistola de aire caliente durante 5 minutos, se enfrió en atmósfera de nitrógeno antes de añadir THF (5 ml) y un pequeño grano de yodo. Se añadió lentamente una solución de (Z)-1-bromodec-4-eno **3** (2 g, 9,1 mmol) en THF (5 ml). La solución se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas y después se añadió glioalato de etilo (0,375 ml, 1,82 mmol, solución al 50% en tolueno). Tras completarse, la solución se inactivó con una solución saturada de cloruro de amonio (5 ml) y se agitó hasta que se disolvió el exceso de magnesio. La solución se diluyó con agua y se extrajo con acetato de etilo (3 x 50 ml). Los extractos combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna (100% de hexanos a EtOAc en hexanos al 20%) para dar el (6Z,16Z)-11-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dieno-11,12-diol **29** en forma de un aceite incoloro (700 mg, 48%).

15 Síntesis del compuesto 30



- 20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 4-(dimetilamino)butanoato de 6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **9**, se obtuvo el 4-(dimetilamino)butanoato (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)-12-hidroxicocosa-6,16-dien-11-ilo **30** en forma de un aceite incoloro (0,10 g, 25%) a partir del (6Z,16Z)-11-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dieno-11,12-diol (0,35 g, 0,7 mmol), hidrocloreto de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (0,20 g, 1,1 mmol), EDCI (0,20 g, 1,1 mmol), diisopropiletilamina (0,3 g, 2,2 mmol) y DMAP (5 mg, catalizador). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,44-5,28 (m, 6H), 5,03-4,95 (m, 1H), 2,25-2,17 (m, 6H), 2,14-1,65 (m, 14H), 1,65-1,10 (m, 33H), 0,93-0,82 (m, 9H). Rf 0,2 (10% de MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

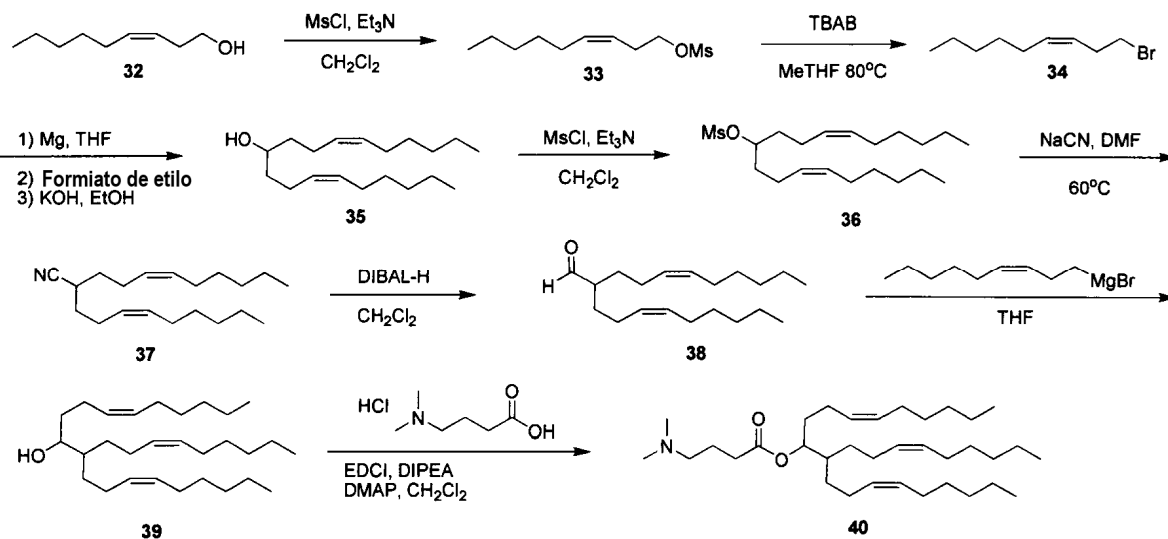
Síntesis del Compuesto 31



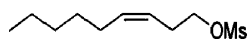
- 25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 4-(dimetilamino)butanoato de 6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **9**, se obtuvo el 3-(dimetilamino)propanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)-12-hidroxicocosa-6,16-dien-11-ilo **31** en forma de un aceite incoloro (0,4 g, 33%) a partir del (6Z,16Z)-11-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dieno-11,12-diol (1,0 g, 2,1 mmol), hidrocloreto de ácido 4-(dimetilamino)butanoico (0,50 g, 3,1 mmol), EDCI (0,60 g, 3,1 mmol), diisopropiletilamina (0,80 g, 6,3 mmol) y DMAP (5 mg, catalizador). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,40-5,28 (m, 6H), 5,12-5,07 (m, 1H), 4,75-4,55 (s ancho, 1H), 2,77-2,65 (m, 1H), 2,65-2,41 (m, 3H), 2,28-2,15 (m, 6H), 2,15-1,92 (m, 12H), 1,67-1,10 (m, 30H), 0,93-0,82 (m, 9H). Rf 0,5 (10% MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).



Esquema sintético para el compuesto 40

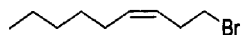


Síntesis del Compuesto 33



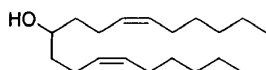
- 5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **2**, se obtuvo el metanosulfonato de (Z)-non-3-enilo **33** en forma de un aceite amarillo (33 g, 85%) a partir de (Z)-non-3-en-1-ol **32** (25,0 g, 176 mmol), trietilamina (25,0 ml) y cloruro de metano sulfonilo (27,2 ml, 352 mmol). Rf 0,68 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Síntesis del Compuesto 34



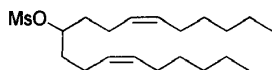
- 10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **3**, se obtuvo el bromuro de (Z)-non-3-enilo **34** en forma de un aceite amarillo (20,2 g, 85%) a partir del metanosulfonato de (Z)-non-3-enilo (25,7 g, 117 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (52,6 g, 163 mmol). Rf 0,73 (hexanos).

Síntesis del Compuesto 35



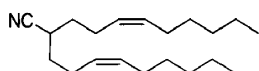
- 15 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **4**, se obtuvo el (6Z,13Z)-nonadeca-6,13-dien-10-ol **35** (9,11 g, 85%) en forma de un aceite incoloro a partir del bromuro de (Z)-non-3-enilo (15,8 g, 76,8 mmol), virutas de magnesio (2,0 g, 82 mmol), formiato de etilo (6,36 ml, 79,1 mmol) e hidróxido de potasio (3,88 g, 69,1 mmol). Rf 0,43 (EtOAc-hexanos al 10%).

Síntesis del Compuesto 36



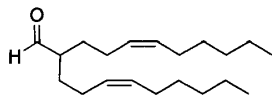
- 20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **5**, se obtuvo el metanosulfonato de (6Z,13Z)-nonadeca-6,13-dien-10-ilo **36** (11,6 g, 99%) en forma de un aceite incoloro a partir del (6Z,13Z)-nonadeca-6,13-dien-10-ol (9,11 g, 32,5 mmol), trietilamina (10 ml) y cloruro de metanosulfonilo (5,0 ml, 65 mmol). Rf 0,73 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Síntesis del Compuesto 37



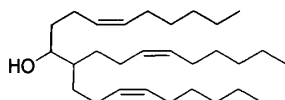
- 25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **6**, se obtuvo el (Z)-2-((Z)-non-3-en-1-yl)undec-5-enonitrilo **37** (7,2 g, 77%) en forma de un aceite incoloro a partir del metanosulfonato de (6Z,13Z)-nonadeca-6,13-dien-10-ilo (11,6 g, 32,3 mmol) y cianuro de sodio (3,96 g, 80,9 mmol). Rf 0,75 (EtOAc-hexanos al 10%).

## Síntesis del Compuesto 38



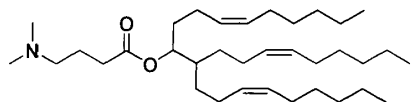
5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **7**, se obtuvo el (Z)-2-((Z)-non-3-en-1-yl)undec-5-enal **38** (5,0 g, 69%) en forma de un aceite incoloro a partir del (Z)-2-((Z)-non-3-en-1-yl)undec-5-enonitrilo (7,2 g, 24,9 mmol) y DIBAL (49,7 ml) como una solución 1 M en hexanos, 49,7 mmol). Rf 0,69 (EtOAc-hexanos al 10).

## Síntesis del Compuesto 39



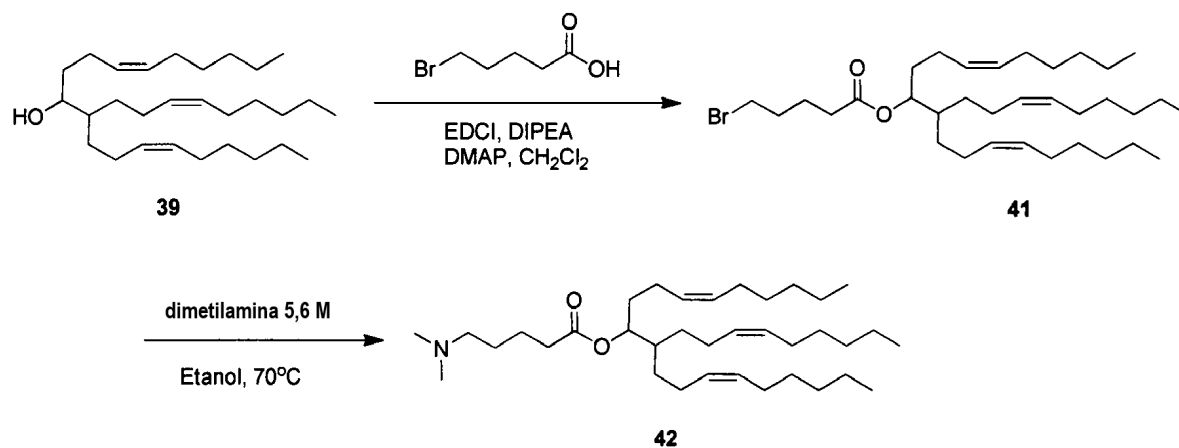
10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **8**, se obtuvo el (6Z,14Z)-11-((Z)-non-3-en-1-yl)icos-6,14-dien-10-ol **39** (1,64 g, 76%) en forma de un aceite incoloro a partir del (Z)-2-((Z)-non-3-en-1-yl)undec-5-enal (1,5 g, 5,1 mmol), bromuro de (Z)-non-3-enilo (1,58 g, 7,7 mmol) y virutas de magnesio (206 mg, 8,5 mmol). Rf 0,46 (AcOEt-Hexanos al 10%).

## Síntesis del Compuesto 40



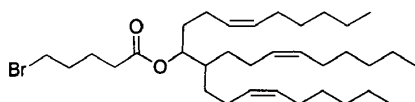
15 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **9**, se obtuvo el 4-(dimetilamino)butanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-yl)docosa-6,16-dien-11-ilo **40** (483 mg, 76%) en forma de un aceite incoloro a partir del (6Z,14Z)-11-((Z)-non-3-en-1-yl)icos-6,14-dien-10-ol (500 mg, 1,19 mmol), EDC (686 mg, 3,58 mmol), base de Hünig (726 µl, 4,17 mmol) y el hidrocloreuro de ácido N,N-dimetilaminobutírico (600 mg, 3,58 mmol). Rf 0,43 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

## Esquema sintético para el compuesto 42



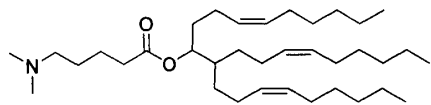
20

## Síntesis del Compuesto 41



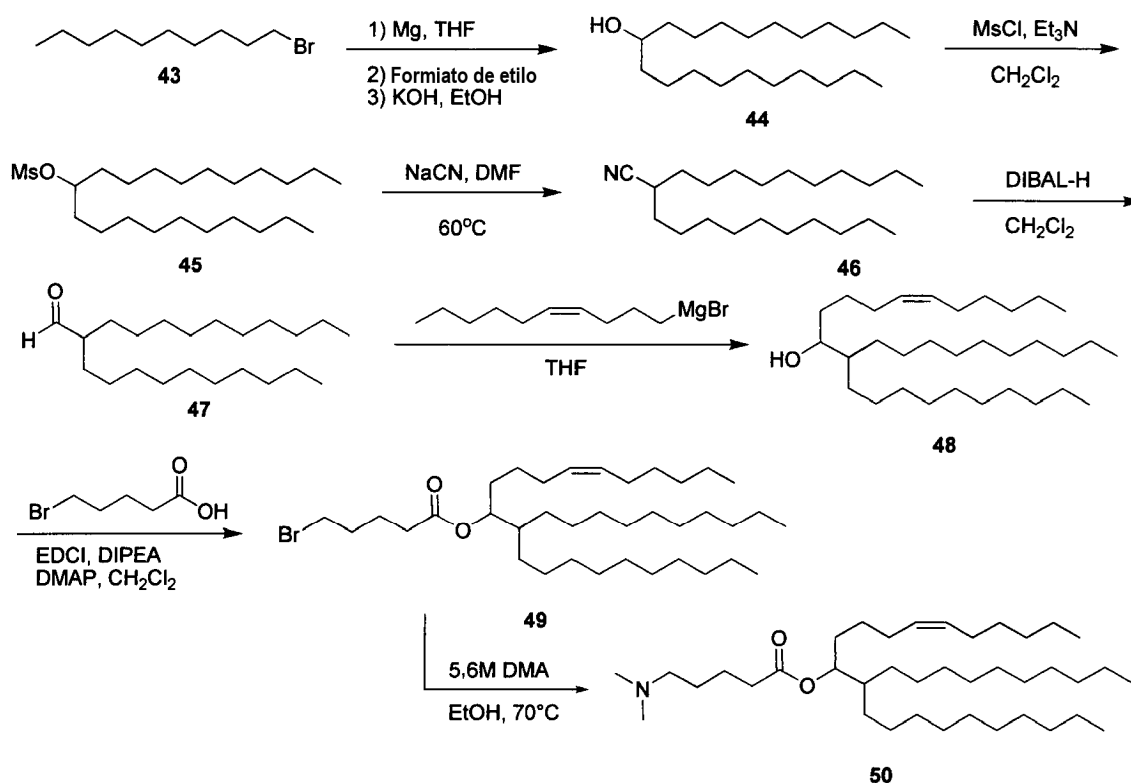
25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (6Z,14Z)-11-((Z)-non-3-en-1-yl)icos-6,14-dien-10-ilo **41** (655 mg, 95%) en forma de un aceite incoloro a partir del (6Z,14Z)-11-((Z)-non-3-en-1-yl)icos-6,14-dien-10-ol (500 mg, 1,19 mmol), EDC (686 mg, 3,58 mmol) y ácido 5-bromovalérico (649 mg, 3,58 mmol). Rf 0,54 (AcOEt-hexanos al 5%).

## Síntesis del Compuesto 42

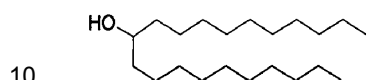


5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (6Z,14Z)-11-((Z)-non-3-en-1-il)icoso-6,14-dien-10-ilo **42** (421 mg, 68%) en forma de un aceite incoloro a partir del 5-bromopentanoato de (6Z,14Z)-11-((Z)-non-3-en-1-il)icoso-6,14-dien-10-ilo (655 mg, 1,13 mmol) y dimetilamina (25 ml como una solución 5,6 M en EtOH). Rf 0,4 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

## Esquema sintético para el compuesto 50



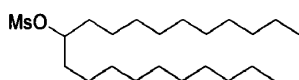
## Síntesis del compuesto 44



10

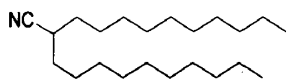
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **4**, se obtuvo el hencosan-11-ol **44** (7,06 g, 99%) en forma de un aceite incoloro a partir del bromodecano (9,4 ml, 45,2 mmol), virutas de magnesio (1,18 g, 48,4 mmol), formiato de etilo (3,74 ml, 46,6 mmol) e hidróxido de potasio (2,28 g, 40,7 mmol). Rf 0,36 (AcOEt-Hexanos al 10%), PM 312,57, C<sub>21</sub>H<sub>44</sub>O.

## 15 Síntesis del Compuesto 45



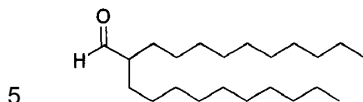
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **5**, se obtuvo el metanosulfonato de hencosan-11-ilo **45** (6,87 g, 78%) en forma de un aceite incoloro a partir del hencosan-11-ol (7,06 g, 22,6 mmol), trietilamina (22 ml) y cloruro de metanosulfonilo (3,5 ml, 45 mmol). Rf 0,86 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

## 20 Síntesis del Compuesto 46



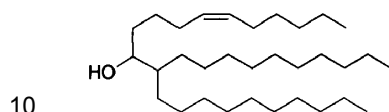
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **6**, se obtuvo el 2-decildodecanonitrilo **46** (2,25 g, 40%) en forma de un aceite incoloro a partir del metanosulfonato de henicosan-11-ilo (6,87 g, 17,6 mmol) y cianuro de sodio (4,31 g, 87,9 mmol). Rf 0,84 (EtOAc-hexanos al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 47



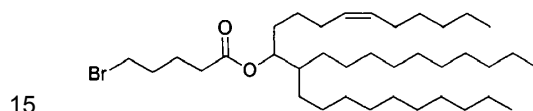
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **7**, se obtuvo el 2-decildodecanal **47** (1,91 g, 84%) en forma de un aceite incoloro a partir del 2-decildodecanonitrilo (2,25 g, 7,0 mmol) y DIBAL (14 ml, como una solución 1 M en hexanos, 14 mmol). Rf 0,51 (AcOEt-hexanos al 5%).

#### Síntesis del Compuesto 48



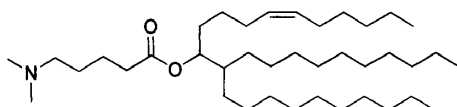
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **8**, se obtuvo el (Z)-12-decildocos-6-en-11-ol **48** (1,08 g, 40%) en forma de un aceite incoloro a partir del 2-decildodecanal (1,91 g, 5,87 mmol), bromuro de (Z)-dec-4-enilo (1,45 g, 7,05 mmol) y virutas de magnesio (183 mg, 7,54 mmol). Rf 0,26 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 49



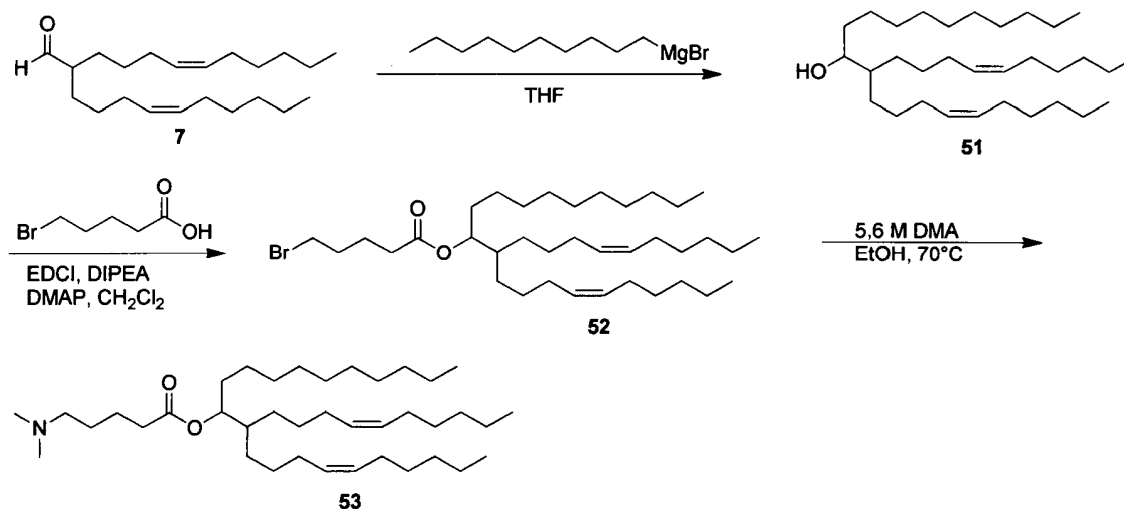
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (Z)-12-decildocos-6-en-11-ilo **49** (916 mg, 63%) en forma de un aceite incoloro a partir del (Z)-12-decildocos-6-en-11-ol (1,08 g, 2,33 mmol), EDC (804 mg, 4,19 mmol) y ácido 5-bromovalérico (1,27 g, 6,99 mmoles). Rf 0,29 (AcOEt-hexanos al 5%).

#### 20 Síntesis del Compuesto 50

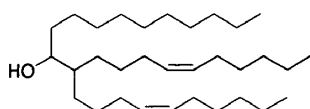


25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (Z)-12-decildocos-6-en-11-ilo **50** (662 mg, 80%) en forma de un aceite incoloro a partir del 5-bromopentanoato de (Z)-12-decildocos-6-en-11-ilo (916 mg, 1,16 mmol) y dimetilamina (27 ml en forma de una solución 5,6 M en EtOH). Rf 0,51 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

Esquema sintético para el compuesto 53

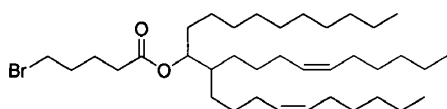


Síntesis del Compuesto 51



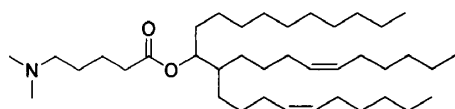
- 5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **8**, se obtuvo el (Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docos-16-en-11-ol **51** (3,37 g, 65%) en forma de un aceite incoloro a partir del (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enal **7** (3,6 g, 11,2 mmol), 1-bromodecano (3,5 ml, 16,9 mmol) y virutas de magnesio (438 mg, 18,0 mmol). Rf 0,31 (AcOEt-hexanos al 5%).

Síntesis del Compuesto 52



- 10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-ilo)docos-16-en-11-ilo **52** (4,69 g, 99%) en forma de un aceite incoloro a partir del (Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docos-16-en-11-ol (3,37 g, 7,29 mmol), EDC (2,51 g, 13,1 mmol) y ácido 5-bromovalérico (3,96 g, 21,8 mmol). Rf 0,56 (AcOEt-hexanos al 5%).

15 Síntesis del Compuesto 53



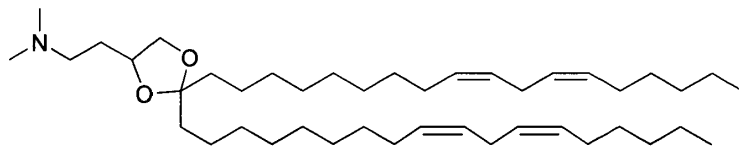
- 20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (Z)-12-decildocos-6-en-11-ilo **53** (943 mg, 99%) en forma de un aceite incoloro a partir del 5-bromopentanoato de (Z)-12-decildocos-6-en-11-ilo (1,0 g, 1,6 mmol) y dimetilamina (30 ml como una solución 5,6 M en EtOH). Rf 0,50 ( $\text{CH}_3\text{OH-CH}_2\text{Cl}_2$  al 10%).

Ejemplo 2

Este ejemplo compara la eficacia, en un modelo murino de actividad de ARNip de ApoB, de los lípidos de trialquilo de cadena corta descritos en la presente memoria con lípidos que tienen cadenas de alquilo más largas pero que por lo demás son estructuralmente idénticos a los lípidos de trialquilo de cadena corta.

- 25 Las formulaciones de partículas de ácido nucleico-lípido que contienen lípidos catiónicos se evaluaron por su capacidad para reducir la expresión de la ApoB en los hígados de ratones BALB/c hembra de 7 a 9 semanas de edad. Se administró a los ratones por vía intravenosa (vena de la cola) en grupos de tres, 0,02, 0,03 o 0,05 mg/kg. La reducción de la expresión de ApoB (normalizada respecto al gen de mantenimiento GAPDH) se midió con respecto al PBS como control negativo. Cada experimento se terminó a las 48 horas después de la administración.

Para la comparación con un control positivo, el rendimiento de los lípidos de trialquilo de cadena corta descritos en la presente memoria se comparó con un potente lípido catiónico, denominado C2K, que se sabe que facilita el suministro de ácido nucleico, in vivo, en partículas de ácido nucleico-lípido (*Nature Biotech.*, Vol 28 (2), 172 (2010)). C2K tiene la siguiente estructura:



**C2K**

- 5 Como se muestra en la tabla 1, con una dosis inyectada de 0,02 mg/kg, 10 de los 11 lípidos catiónicos descritos en la presente memoria (compuestos **9**, **13**, **14**, **19**, **22**, **27**, **40**, **42**, **50** y **53**) presentaron mayor actividad que C2K.

Tabla 1: Silenciamiento de ApoB (ARNip 0,02 mg/kg) para varios lípidos catiónicos de trialquilo.

Dosis de ARNip	Compuesto	Silenciamiento del gen ApoB con respecto al control de PBS (relación ARNm de ApoB:GAPD del hígado)
0,02 mg/kg	C2K	-61%
	9	-73%
	13	-80%
	14	-69%
	19	-79%
	22	-79%
	24	-48%
	27	-68%
	40	-80%
	42	-77%
	50	-72%
53	-78%	

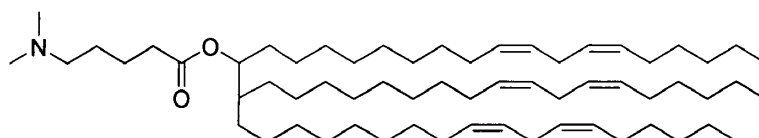
- 10 Como se muestra en la tabla 2, en un experimento separado, con una dosis inyectada de 0,03 mg/kg, 5 de los 7 lípidos catiónicos descritos en la presente memoria (compuestos **11**, **13**, **19**, **23** y **25**) presentaron mayor actividad que C2K.

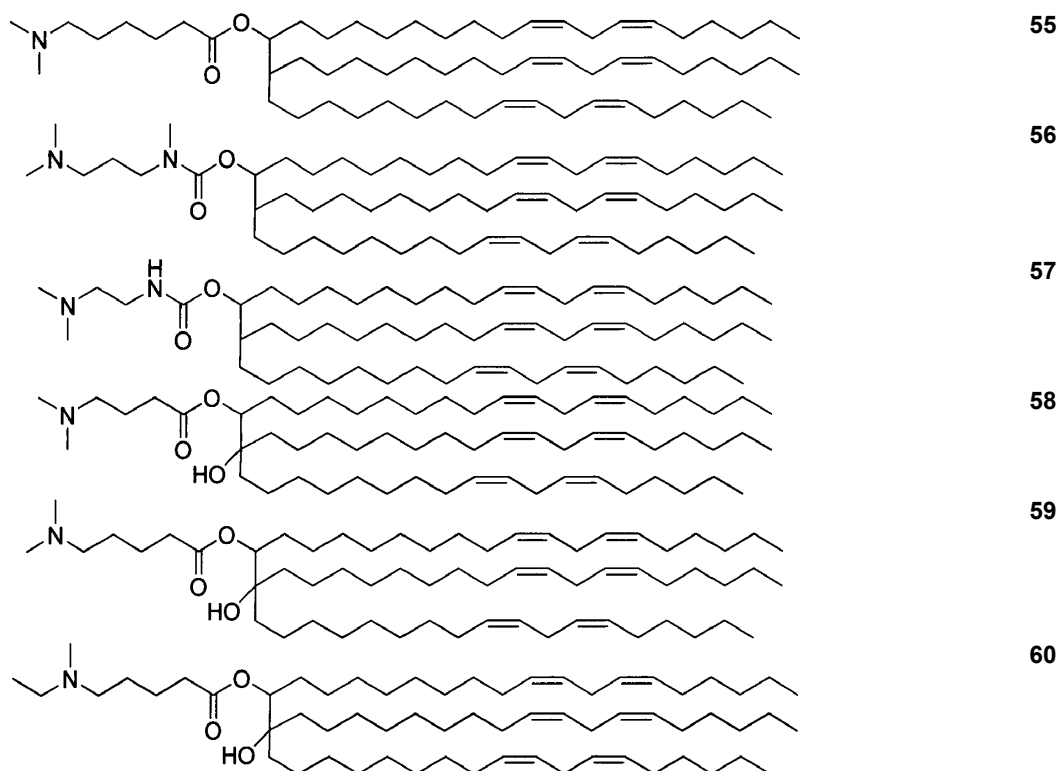
Tabla 2: Silenciamiento de ApoB (ARNip 0,03 mg/kg) para varios lípidos catiónicos de trialquilo de cadena corta

Dosis de ARNip	Compuesto	Silenciamiento del gen ApoB con respecto al control de PBS (relación ARNm de ApoB:GAPD del hígado)
0,03 mg/kg	C2K	-54%
	9	-49%
	11	-78%
	13	-84%
	19	-87%
	23	-80%
	25	-63%
	30	-30%

- 15 La actividad de los lípidos catiónicos descritos en la presente memoria también se comparó con los correspondientes lípidos catiónicos de trialquilo que son estructuralmente idénticos a los lípidos descritos en la presente memoria, excepto que las cadenas de alquilo son más largas. Las estructuras de estos lípidos catiónicos de trialquilo de cadena más larga (identificados como compuestos **54**, **55**, **56**, **57**, **58**, **59** y **60**) se muestran en la tabla 3.

- 20 Tabla 3: Estructuras de lípidos catiónicos de trialquilo de cadena larga





Los compuestos **54**, **55**, **56**, **57**, **58**, **59** y **60** se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. n° 13/235.253, presentada el 16 de septiembre de 2011.

- 5 Como se muestra en la tabla 4, los lípidos de cadena más larga **54**, **55**, **56**, **57**, **58**, **59**, **60** se administraron en 0,05 mg/kg (2,5 veces la dosis descrita en la tabla 1), y presentaron una reducción de la expresión de ApoB que varía de +25% a -69% en comparación con 60% para C2K (es decir, algunos compuestos presentaban una mejora moderada frente a C2K).

Tabla 4: Silenciamiento de ApoB (ARNip 0,05 m/k) para varios lípidos catiónicos de trilinoleilo

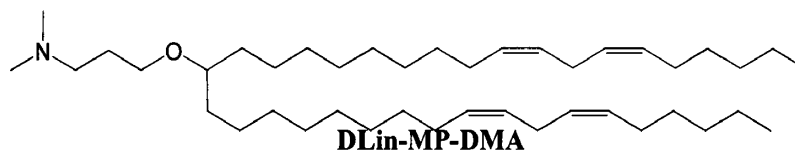
Dosis de ARNip	Compuesto	Silenciamiento del gen ApoB con respecto al control de PBS (relación ARNm de ApoB:GAPD del hígado)
0,05 mg/kg	C2K	-60% <sup>a</sup>
	54	-6%
	55	-28%
	56	-23%
	57	+25%
	58	-62%
	59	-69%
	60	-63%

<sup>a</sup> Silenciamiento medio de ApoB frente a cuatro estudios

- 10 En general, la actividad de los lípidos catiónicos de trialquilo de cadena más corta (C9 a C10) descritos en la presente memoria mejoró sustancialmente en comparación con el correspondiente lípido homólogo de cadena más larga, trilinoleilo (C18). Por ejemplo, una comparación directa de compuestos **13** con su variante de trilinoleilo **54** mostró una mejora de -6% (0,05 mg/kg) a -80% (0,02 mg/kg) en la reducción de la expresión de ApoB, a pesar del hecho de que el compuesto **13** se administró con una dosis 2,5 veces más baja. Se observó la misma tendencia al
- 15 comparar los compuestos **55** a **11**, **56** a **24** y **57** a **25**.

## Ejemplo 3

Experimentos adicionales en el modelo de ApoB murino usaban un lípido catiónico diferente como control positivo; DLin-MP-DMA. DLin-MP-DMA se describe en la solicitud de patente WO 2011/141705, y tiene la estructura:



- 5 Como se muestra en la tabla 5, en el mismo modelo de ApoB murino, se mostró que DLin-MP-DMA es más eficaz que C2K en tres experimentos separados, y por lo tanto es un control positivo válido:

Tabla 5. Comparación entre C2K y DLin-MP-DMA como controles positivos

	Dosis de ARNip	Compuesto	Silenciamiento del gen ApoB con respecto al control de PBS (relación ARNm de ApoB:GAPD del hígado)
Experimento 1	0,03 mg/kg	C2K	-51%
		DLin-MP-DMA	-69%
Experimento 2	0,05 mg/kg	C2K	-59%
		DLin-MP-DMA	-65%
Experimento 3	0,03 mg/kg	C2K	-54%
		DLin-MP-DMA	-62%

- 10 En otro experimento, dos lípidos más descritos en la presente memoria (compuestos 62 y 71) se formularon en nanopartículas lipídicas con ARNip para dirigirse a ApoB. Se administró la dosis a los ratones por vía intravenosa (vena de la cola) y se sacrificaron 48 h después de la administración. Los hígados se recogieron y se homogeneizaron, y después se midió el nivel de silenciamiento de ApoB (normalizado con respecto al gen de mantenimiento GAPDH) mediante el ensayo Quantigene. Los resultados se muestran en la tabla 6 y se expresan como un porcentaje, con respecto a un grupo de control negativo tratado con PBS. La secuencia de ARNip usada en este experimento era diferente y menos potente que la usada en el ejemplo 2. Por lo tanto, no son posibles las
- 15 comparaciones entre los experimentos:

Tabla 6: Silenciamiento de ApoB para diferentes lípidos catiónicos de trialquilo.

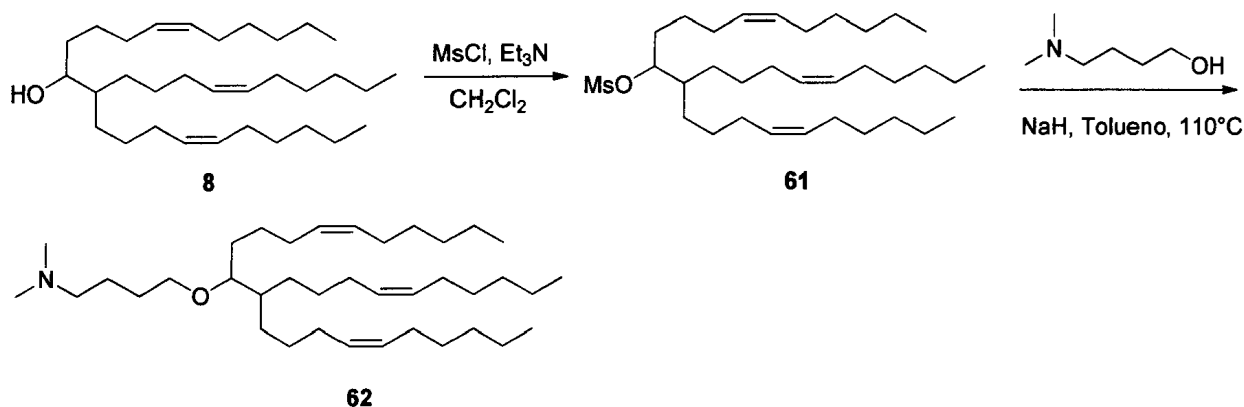
Dosis de ARNip	Compuesto	Silenciamiento del gen ApoB con respecto al control de PBS (relación ARNm de ApoB:GAPD del hígado)
0,04 mg/kg	DLin-MP-DMA	-32%
	Compuesto 62	-56%
	Compuesto 71	-29%

- 20 El compuesto 71 tenía una actividad similar al control DLin-MP-DMA. El compuesto 62 era significativamente más activo. La síntesis de estos y otros compuestos se describe en el ejemplo 4.

## Ejemplo 4

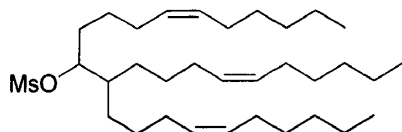
Este ejemplo describe la síntesis de compuestos adicionales descritos en la presente memoria.

Esquema sintético para el compuesto 62



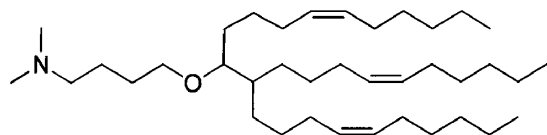


## Síntesis del Compuesto 61



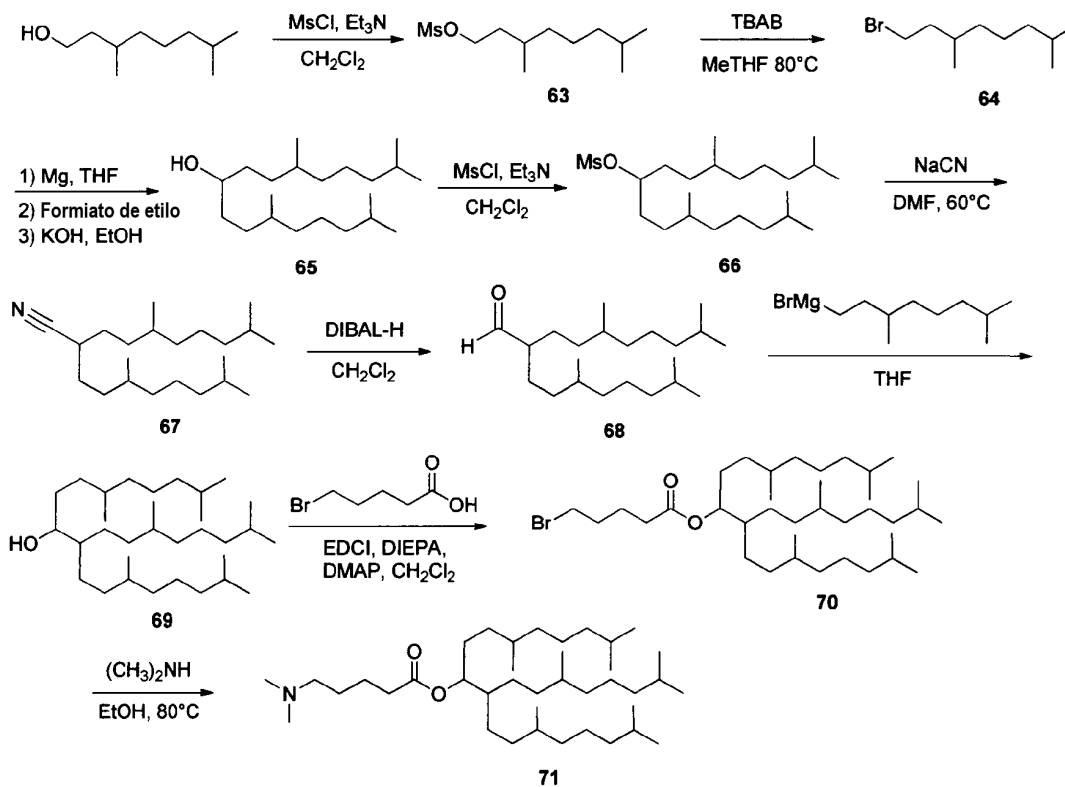
5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **5**, se obtuvo el metanosulfonato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,16-dien-11-ilo **61** (1,18 g, 90%) en forma de un aceite incoloro a partir del (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (1,12 g, 2,43 mmol), trietilamina (8 ml) y cloruro de metanosulfonilo (0,38 ml, 4,9 mmol). Rf 0,91 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

## Síntesis del Compuesto 62

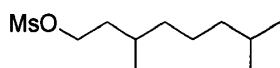


10 Una solución del mesilato **61** (1,09g, 2,01 mmol) en tolueno (30 ml) se trató sucesivamente con N,N-dimetilaminobutanol (1,34 ml, 10,1 mmol) y NaH (442 mg como una dispersión al 60% en aceite, 11,1 mmol). Una vez que cesó el desprendimiento de gas, la mezcla de reacción se llevó a reflujo (temperatura de baño 115°C) y se agitó (50 h). Después la mezcla de reacción se enfrió (t.a.) y se vertió en agua fría y después se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se lavaron con agua y salmuera, se secaron (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), se filtraron, se concentraron y se purificaron por cromatografía (100% de EtOAc) para dar la 4-(((6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,16-dien-11-il)oxi)-N,N-dimetilbutan-1-amina **62** (143mg, 13%) en forma de un aceite amarillo pálido. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,41-5,30 (m, 6H), 3,46-3,35 (m, 2H), 3,19-3,14 (m, 1H), 2,34 (t, 2H), 2,24 (s, 6H), 2,10-1,93 (m, 12H), 1,60-1,09 (m, 35H), 0,90 (t, 9H). Rf 0,54 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

## Esquema sintético para el compuesto 71

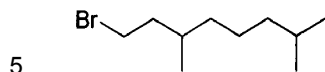


## 20 Síntesis del Compuesto 63



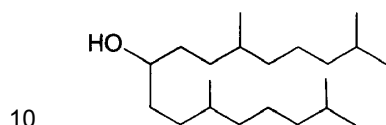
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **5**, se obtuvo el metanosulfonato de 3,7-dimetiloctilo **63** (7,47 g, > 99%) en forma de un aceite incoloro a partir del 3,7-dimetiloctan-1-ol (5,0 g, 31,6 mmol), trietilamina (8 ml) y cloruro de metanosulfonilo (4,89 ml, 63,2 mmol). Rf 0,69 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### Síntesis del Compuesto 64



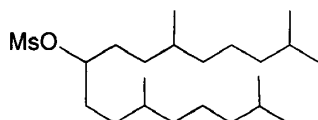
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **3**, se obtuvo el 1-bromo-3,7-dimetiloctano **64** en forma de un aceite incoloro (6,0 g, 86%) a partir del metanosulfonato de 3,7-dimetiloctilo **63** (7,47 g, 31,6 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (13,2 g, 41,1 mmol). Rf 0,92 (hexanos).

#### Síntesis del Compuesto 65



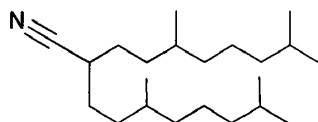
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **4**, se obtuvo el 2,6,12,16-tetrametilheptadecan-9-ol **65** (7,0 g, cuantitativo) en forma de un aceite incoloro a partir del 1-bromo-3,7-dimetiloctano **64** (10 g, 45,2 mmol), virutas de magnesio (1,21 g, 49,8 mmol), formiato de etilo (3,8 ml, 47,5 mmol) e hidróxido de potasio (3,8 g, 67,8 mmol). Rf 0,38 (EtOAc-hexanos al 10%).

#### 15 Síntesis del Compuesto 66



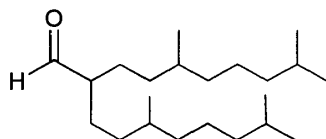
20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **5**, se obtuvo el metanosulfonato de 2,6,12,16-tetrametilheptadecan-9-ilo **66** (1,56 g, 87%) en forma de un aceite incoloro a partir del 2,6,12,16-tetrametilheptadecan-9-ol **65** (1,39 g, 5,14 mmol), trietilamina (3 ml) y cloruro de metanosulfonilo (0,8 ml, 10,3 mmol). Rf 0,8 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

#### Síntesis del Compuesto 67



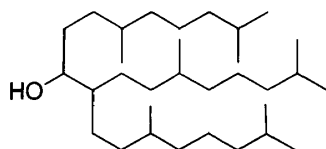
25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **6**, se obtuvo el 2-(3,7-dimetiloctil)-5,9-dimetildecanonitrilo **67** (0,8 g, 56%) en forma de un aceite incoloro a partir del metanosulfonato de 2,6,12,16-tetrametilheptadecan-9-ilo **66** (1,56 g, 4,48 mmol) y cianuro de sodio (0,55 g, 11,2 mmol). Rf 0,8 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 68



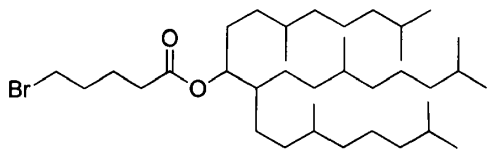
30 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **7**, se obtuvo el 2-(3,7-dimetiloctil)-5,9-dimetildecanal **68** (0,63 g, 78%) en forma de un aceite incoloro a partir del 2-(3,7-dimetiloctil)-5,9-dimetildecanonitrilo **67** (0,8 g, 2,49 mmol) y DIBAL (5,74 ml como una solución 1 M en hexanos, 5,74 mmol). Rf 0,6 (AcOEt-Hexanos al 10%).

#### Síntesis del compuesto 69



Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **8**, se obtuvo el 10-(3,7-dimetiloctil)-2,6,13,17-tetrametiloctadecan-9-ol **69** (0,53 g, 62%) en forma de un aceite incoloro a partir del 2-(3,7-dimetiloctil)-5,9-dimetildecenal **68** (0,6 g, 1,85 mmol), 1-bromo-3,7-dimetiloctano **64** (2,0 g, 9,0 mmol) y virutas de magnesio (232 mg, 9,67 mmol). Rf 0,37 (EtOAc-hexanos al 10%).

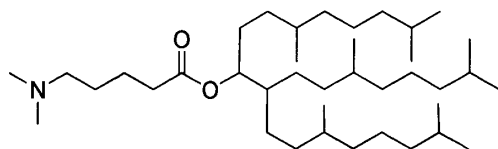
#### 5 Síntesis del compuesto 70



Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de 10-(3,7-dimetiloctil)-2,6,13,17-tetrametiloctadecan-9-ilo **68** (450 mg, bruto) en forma de un aceite amarillo a partir del 10-(3,7-dimetiloctil)-2,6,13,17-tetrametiloctadecan-9-ol **69** (200 mg, 0,43 mmol), EDC (246 mg, 1,28 mmol) y ácido 5-bromovalérico (246 mg, 1,28 mmol). Rf 0,49 (AcOEt-hexanos al 5%).

10

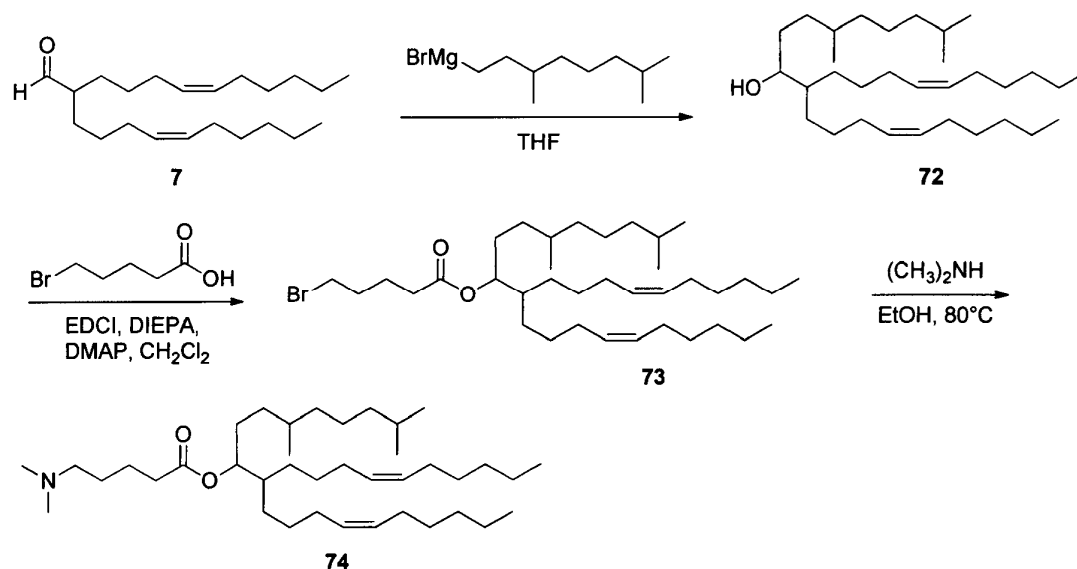
#### Síntesis del Compuesto 71



Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de 10-(3,7-dimetiloctil)-2,6,13,17-tetrametiloctadecan-9-ilo **71** (184 mg, 72% en 2 etapas) en forma de un aceite incoloro a partir del 5-bromopentanoato de 10-(3,7-dimetiloctil)-2,6,13,17-tetrametiloctadecan-9-ilo **68** (450 mg bruto) y dimetilamina (10 ml como una solución 2,0 M en EtOH). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 4,95-4,87 (m, 1H), 2,33 (t, 2H), 2,28 (t, 2H), 2,23 (s, 6H), 1,74-1,60 (m, 4H), 1,58-0,99 (m, 37H), 0,93-0,79 (m, 27H). Rf 0,43 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

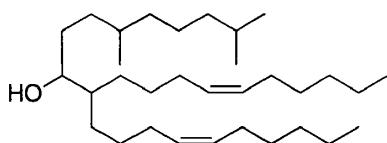
15

#### Esquema sintético para el compuesto 74



20

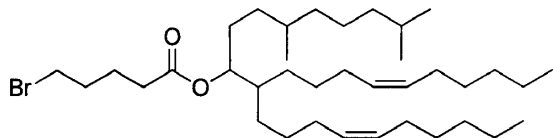
#### Síntesis del Compuesto 72



Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **8**, se obtuvo el (Z)-10-((Z)-dec-4-en-1-yl)-2,6-dimethyl-14-en-9-ol **72** (0,62 g, 72%) en forma de un aceite incoloro a partir del (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enal

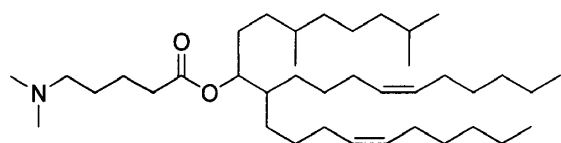
7 (0,6 g, 1,87 mmol), 1-bromo-3,7-dimetiloctano **64** (3,9 g, 17,5 mmol) y virutas de magnesio (454 mg, 18,7 mmol). Rf 0,61 (EtOAc-hexanos al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 73



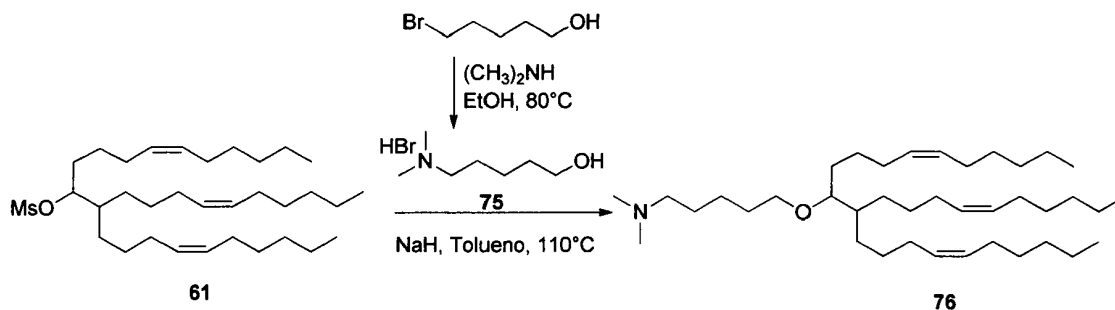
- 5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (Z)-10-((Z)-dec-4-en-1-il)-2,6-dimetilicos-14-en-9-ilo **73** (900 mg, bruto) en forma de un aceite amarillo a partir del (Z)-10-((Z)-dec-4-en-1-il)-2,6-dimetilicos-14-en-9-ol **72** (620 mg, 1,34 mmoles), EDC (500 mg, 2,6 mmoles) y ácido 5-bromoaléico (500 mg, 2,56 mmoles). Rf 0,72 (EtOAc-hexanos al 10%).

#### Síntesis del Compuesto 74

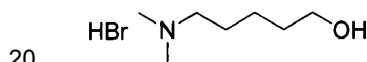


- 10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (Z)-10-((Z)-dec-4-en-1-il)-2,6-dimetilicos-14-en-9-ilo **74** (466 mg, 58% en 2 etapas) en forma de un aceite incoloro a partir del 5-bromopentanoato de (Z)-10-((Z)-dec-4-en-1-il)-2,6-dimetilicos-14-en-9-ilo **73** (900 mg, bruto) y dimetilamina (15 ml como una solución 2,0 M en EtOH). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,43-5,29 (m, 4H), 4,94-4,88 (m, 1H), 2,32 (t, 2H), 2,26 (t, 2H), 2,15 (s, 6H), 2,08-1,93 (m, 8H), 1,70-1,00 (m, 43H), 0,95-0,83 (m, 15H). Rf 0,42 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

#### Esquema sintético para el compuesto 76

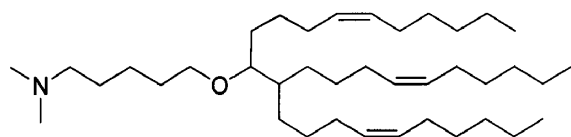


#### Síntesis del compuesto 75



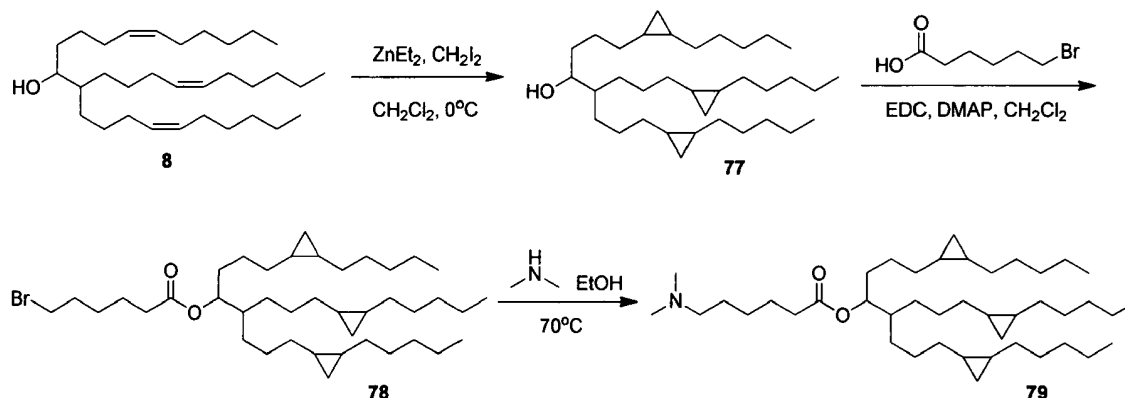
- 20 Se preparó una solución de 5-bromopentán-1-ol (1,0 g, 5,99 mmol) con dimetilamina (10 ml, como una solución 2 M en EtOH) en un recipiente sellado y se calentó (80°C). Después de agitar (16 h), se separaron la dimetilamina y el EtOH a presión reducida para dar el hidrobromuro del 5-(dimetilamino)pentán-1-ol **75** (1,26 g, cuantitativo) en forma de un sólido amarillo-naranja. Rf 0,25 (CH<sub>3</sub>OH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

#### Síntesis del compuesto 76

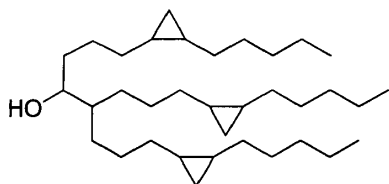


- 25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **62**, se obtuvo la 5-(((6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,16-dien-11-il)oxi)-N,N-dimetilpentan-1-amina **76** (864 mg, 37%) en forma de un aceite amarillo pálido a partir del metanosulfonato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-en-1-il)docosa-6,16-dien-11-ilo **61** (1,86 g, 3,45 mmol), hidrobromuro del 5-(dimetilamino)pentán-1-ol **75** (1,26 g, 5,99 mmoles) y NaH (288 mg como una dispersión al 60% en aceite, 7,2 mmoles). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,43-5,32 (m, 6H), 3,46-3,33 (m, 2H), 3,18-3,12 (m, 1H), 2,30-2,18 (m, 8H), 2,07-1,93 (m, 12H), 1,61-1,04 (m, 37H), 0,89 (t, 9H). Rf 0,47 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

## Esquema sintético para el compuesto 79

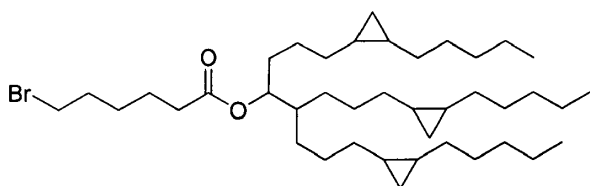


## Síntesis del Compuesto 77



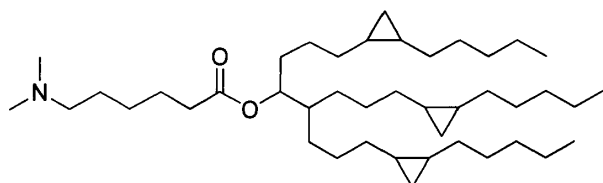
- 5 A una solución enfriada (-15°C) de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **8** (5 g, 10,9 mmol) en diclorometano anhidro (125 ml) en atmósfera de nitrógeno se añadió gota a gota, dietil-zinc (1 M en hexano, 82 ml, 81,8 mmol) a lo largo de 20 minutos. La solución se agitó durante 70 minutos a 0°C y después se añadió con cuidado diiodometano (6,6 ml, 81,8 mmol). La solución se agitó durante la noche, dejando que se calentara a temperatura ambiente. Tras completarse, la solución se vertió en agua-hielo (350 ml) y se diluyó con acetato de etilo (450 ml). Después se añadió HCl al 5% (350 ml) para ayudar a aliviar la emulsión que se había formado. La capa orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> (ac. sat. 500 ml), agua (500 ml) y salmuera (500 ml). Las capas acuosas combinadas se extrajeron de nuevo con acetato de etilo. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre sulfato magnésico, se filtraron y se concentraron a vacío hasta sequedad. El residuo se purificó por cromatografía en columna en gel de sílice (acetato de etilo en hexanos al 2,5%) para dar un aceite de color rosa. Para eliminar el color (I<sub>2</sub>), el producto purificado se disolvió en diclorometano (150 ml) y se lavó con Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (ac. sat. 2 x 40 ml) para proporcionar el 1,8-bis(2-pentilciclopropil)-5-(3-(2-pentilciclopropil)propil)octan-4-ol **77** en forma de un aceite amarillo pálido (5,54 g, 96,5%).

## Síntesis del Compuesto 78



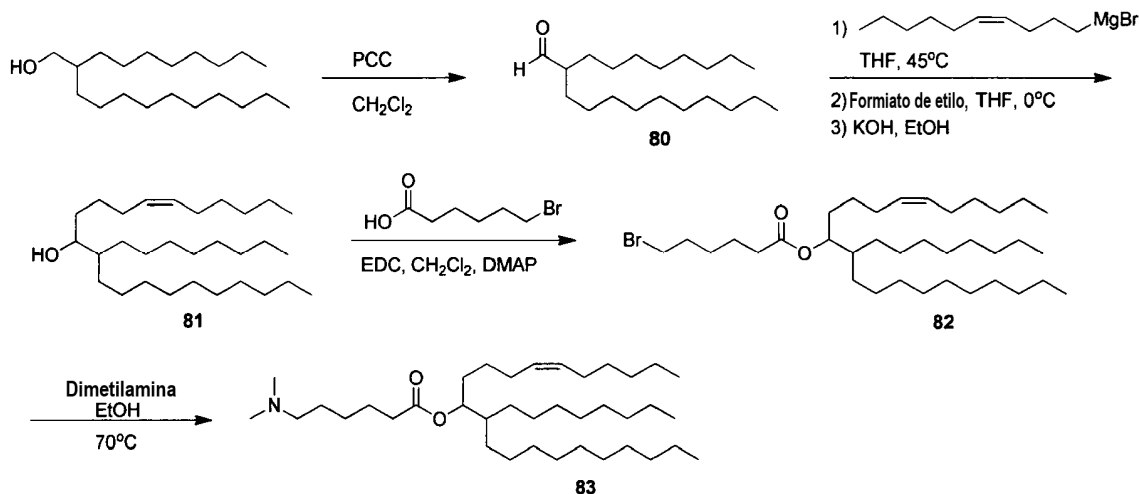
- 20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10**, se obtuvo el 6-bromohexanoato de 1,8-bis(2-pentilciclopropil)-5-(3-(2-pentilciclopropil)propil)octan-4-ilo en forma de un aceite bruto a partir del 6-(dimetilamino)hexanoato de 1,8-bis(2-pentilciclopropil)-5-(3-(2-pentilciclopropil)propil)octan-4-ilo (0,75 g, 1,5 mmol), diclorometano anhidro (5,2 ml), ácido 6-bromohexanoico (0,88 g, 4,5 mmol), hidrocloreuro del 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,87 g, 4,5 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (5 mg). El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

## Síntesis del Compuesto 79

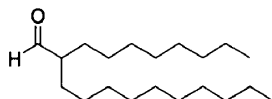


Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11**, se obtuvo en forma de un aceite (0,56 g, 59%) a partir del 6-bromohexanoato de 1,8-bis(2-pentilciclopropil)-5-(3-(2-pentilciclopropil)propil)octan-4-ilo (1,0 g, 1,5 mmol) ) y dimetilamina 2,0 M en etanol (3,5 ml). Rf 0,50 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

### 5 Esquema sintético para el compuesto 83

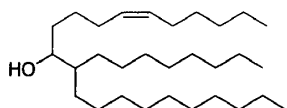


### Síntesis del compuesto 80



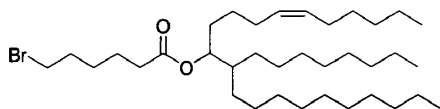
10 A una solución de 2-cildidecan-1-ol (20 g, 67,0 mmol) en diclorometano anhidro (500 ml) se le añadió clorocromato de piridinio (43,2 g, 200 mmol). La solución se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente, después se filtró a través de una almohadilla de sílice y se eluyó con diclorometano para proporcionar 2-octildodecanal **80** en forma de un aceite incoloro (10,5 g, 50%).

### Síntesis del compuesto 81



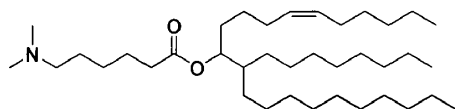
15 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del (6Z,15Z)-hencosa-6,15-dien-11-ol **4**, se obtuvo el (Z)-12-octildocos-6-en-11-ol **81** en forma de un aceite incoloro (0,67 g, 92%) a partir del 2-octildodecanal **80** (0,5 g, 1,6 mmol), (Z)-1-bromodece-4-eno (0,7 g, 3,1 mmol), magnesio (80 mg, 3,4 mmol), tetrahidrofurano anhidro (0,5 ml), agua (2 ml), EtOH (2 ml) y KOH (0,2 g, 2,8 mmol).

### Síntesis del compuesto 82



20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10**, se obtuvo el 6-bromohexanoato de (Z)-12-octildocos-6-en-11-ilo **82** en forma de un aceite incoloro (0,78 g, 85%) a partir del (Z)-12-octildocos-6-en-11-ol **81** (0,67 g, 1,5 mmol), diclorometano anhidro (5 ml), ácido 6-bromohexanoico (0,80 g, 4,4 mmol), hidrocloreuro de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (0,85 g, 4,4 mmol) y 4-dimetilaminopiridina (5 mg). El producto se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

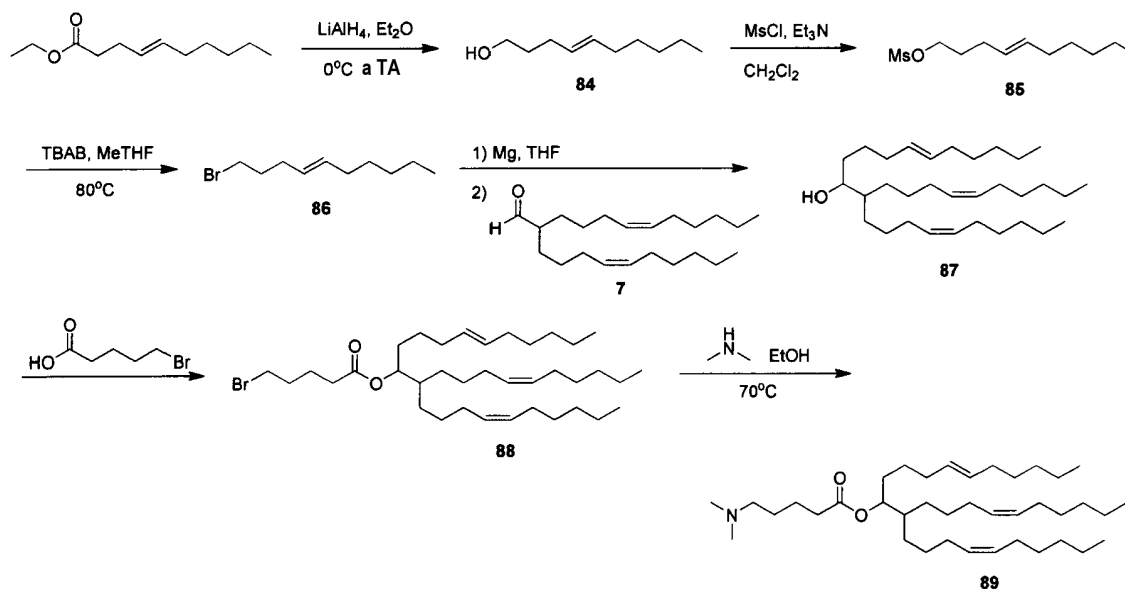
### Síntesis del compuesto 83



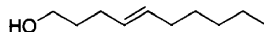
Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11**, se obtuvo el 6-(dimetilamino)hexanoato de (Z)-12-octildocos-6-en-11-ilo **83** en forma de un aceite (103 mg, 14%) a partir del 6-bromohexanoato de (Z)-12-octildocos-6-en-11-ilo **82** (0,78 g, 1,3 mmol) y dimetilamina 2,0 M en etanol (3 ml). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,43-5,26 (m, 2H), 4,96-4,91 (m, 1H), 2,33 (t, 4H), 2,26 (s, 6H), 2,08-1,93 (m, 4H), 1,70-1,60 (m, 2H), 1,57-1,43 (m, 4H), 1,40-1,15 (m, 43H), 0,94-0,85 (m, 9H).

5

Esquema sintético para el compuesto 89

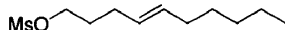


Síntesis del compuesto 84



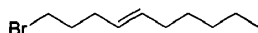
10 A una solución enfriada (0°C) de (E)-dec-4-enoato de etilo (20 g, 101 mmol) en éter dietílico anhidro (350 ml) se añadió hidruro de litio y aluminio (8,9 g, 212 mmol) en atmósfera de nitrógeno. La solución se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente, después se enfrió a 0°C y se inactivó lentamente con NaOH 5 M (30 ml) y se diluyó con éter etílico (100 ml). La solución se agitó durante 30 minutos y se secó sobre sulfato magnésico, se filtró y se concentró a vacío hasta sequedad para proporcionar el (E)-dec-4-en-1-ol **84** en forma de un aceite (16,1 g, cuantitativo).

15 Síntesis del compuesto 85



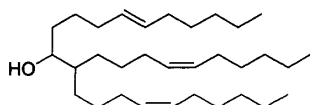
20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de metanosulfonato de (Z)-dec-4-enilo **2**, se obtuvo el metanosulfonato de (E)-dec-4-enilo **85** en forma de un aceite naranja (32,7 g) a partir del (E)-dec-4-en-1-ol (16,1 g, 94,7 mmol), trietilamina (15,5 ml, 111,7 mmol) y cloruro de metanosulfonilo (15,6 ml, 201,7 mmol). Rf 0,65 (100% de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>).

Síntesis del compuesto 86



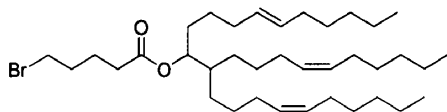
25 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del (Z)-1-bromodec-4-eno **3**, se obtuvo el (E)-1-bromodec-4-eno **86** en forma de aceite (17,9 g, 81%) a partir del metanosulfonato de (E)-dec-4-enilo **85** (23,5 g, 94,7 mmol) y bromuro de tetrabutilamonio (40,0 g, 124,1 mmol). Rf 0,85 (AcOEt-Hexanos al 10%).

Síntesis del compuesto 87



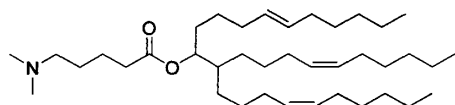
30 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis para proporciona el (6Z,15Z)-henciosa-6,15-dien-11-ol **4**, se obtuvo el (6E,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **87** en forma de aceite (1,28 g, 71%) a partir del (E)-1-bromodec-4-eno **86** (1,7 g, 7,8 mmol), virutas de magnesio (0,19 g, 7,8 mmol), (Z)-2-((Z)-dec-4-enil)dodec-6-enal **7** (1,25 g, 3,9 mmol) e hidróxido de potasio (0,66 g, 11,7 mmol). Rf 0,43 (EtOAc-hexanos al 10%).

## Síntesis del compuesto 88



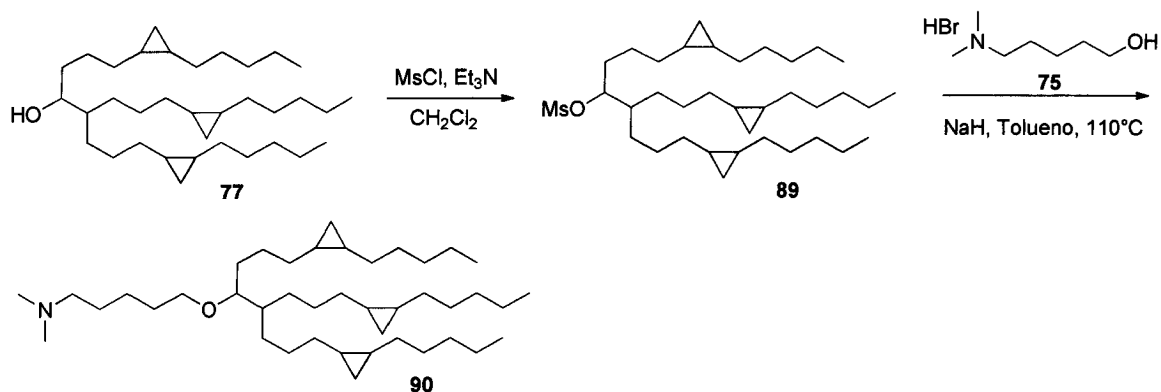
- 5 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis del 6-bromohexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **10**, se obtuvo el 5-bromopentanoato de (6E,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **88** en forma de aceite (1,36 g, 78%) a partir del (6E,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ol **87** (1,28 g, 2,8 mmol) y ácido 5-bromo-n-valérico (1,00 g, 5,6 mmol), hidrocloreuro de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (1,06 g, 5,6 mmol), diisopropiletilamina (1,1 g, 83,0 mmol) y dimetilaminopiridina (10 mg).

## Síntesis del compuesto 89

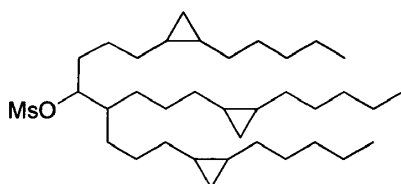


- 10 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de 6-(dimetilamino)hexanoato de (6Z,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **11**, se obtuvo el 5-(dimetilamino)pentanoato de (6E,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **89** en forma de aceite (0,45 g, 35%) a partir del 5-bromopentanoato de (6E,16Z)-12-((Z)-dec-4-enil)docosa-6,16-dien-11-ilo **88** (1,36 g, 2,2 mmol) y dimetilamina 2 M en etanol (5 ml). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5,45-5,28 (m, 6H), 4,96-4,91 (m, 1H), 2,34-2,25 (m, 2H), 2,06-1,90 (m, 12H), 1,68-1,61 (m, 2H), 1,55-1,45 (m, 5H), 1,45-1,16 (m, 28H), 0,95-0,84 (m, 9H). Rf 0,46 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).
- 15

## Esquema sintético para el compuesto 90

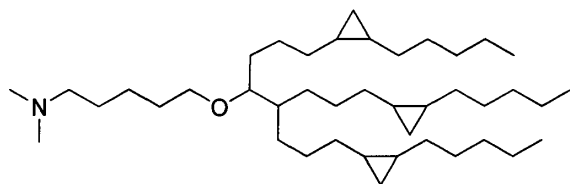


## Síntesis del compuesto 89



- 20 Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **5**, se obtuvo el metanosulfonato de 1,8-bis(2-pentilciclopropil)-5-(3-(2-pentilciclopropil)propil)octan-4-ilo **89** en forma de un aceite incoloro.

## Síntesis del compuesto 90





## ES 2 702 874 T3

Usando un procedimiento análogo al descrito para la síntesis de **62**, se obtuvo la 5-((1,8-bis(2-pentilciclopropil)-5-(3-(2-pentilciclopropil)propil)octan-4-il)oxi)-N,N-dimetilpentan-1-amina **90** (580 mg) en forma de un aceite amarillo pálido. Rf 0,48 (MeOH-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> al 10%).

REIVINDICACIONES

1. Un lípido que tiene una fórmula estructura (I):



(I)

5 o sus sales, en donde:

X es alquilamino;

A es alquilo o cicloalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido,

en donde dicho alquilo o cicloalquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> opcionalmente sustituido puede ser saturado o insaturado,

en donde A puede estar presente o no, y

10 en donde la expresión "alquilo o cicloalquilo opcionalmente sustituido" se refiere a la sustitución de al menos un átomo de hidrógeno por un sustituyente, seleccionado del grupo que consiste en oxo, halógeno, heterociclo, -CN, -OR<sup>x</sup>, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>, y -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>,

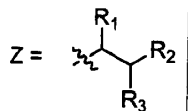
en donde

n es 0, 1 o 2,

15 R<sup>x</sup> y R<sup>y</sup> son iguales o diferentes y son independientemente hidrógeno, alquilo o heterociclo, y cada uno de los sustituyentes alquilo y heterociclo puede estar además sustituido con uno o más de oxo, halógeno, -OH, -CN, alquilo, -OR<sup>x</sup>, heterociclo, -NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>C(=O)R<sup>y</sup>, -NR<sup>x</sup>SO<sub>2</sub>R<sup>y</sup>, -C(=O)R<sup>x</sup>, -C(=O)OR<sup>x</sup>, -C(=O)NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>, -SO<sub>n</sub>R<sup>x</sup>, y -SO<sub>n</sub>NR<sup>x</sup>R<sup>y</sup>;

20 Y se selecciona del grupo que consiste en cetal, éster, carbamato opcionalmente sustituido con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> saturado o insaturado, éter, y amida opcionalmente sustituida con un grupo alquilo C<sub>1</sub> a C<sub>6</sub> saturado o insaturado; y

Z tiene la fórmula:

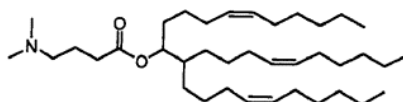


25 en donde, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> se selecciona cada uno independientemente del grupo que consiste en alquilo C<sub>8</sub> a C<sub>11</sub>, en donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> puede ser independientemente saturado o insaturado, y en donde cada uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> está opcionalmente sustituido con un grupo hidroxilo.

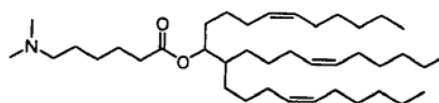
2. El lípido de la reivindicación 1, en donde al menos uno de R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> tiene un doble enlace, preferiblemente un doble enlace cis.

30 3. El lípido de la reivindicación 1, en donde X se selecciona del grupo que consiste en dimetilamino, dietilamino y etilmetilamino.

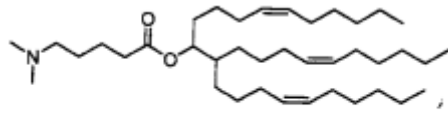
4. El lípido de la reivindicación 1, seleccionado del grupo que consiste en:



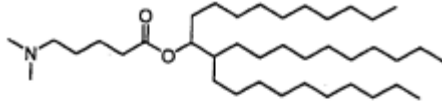
Compuesto 9,



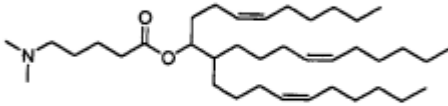
Compuesto 11,



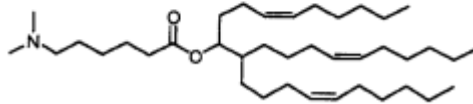
Compuesto 13,



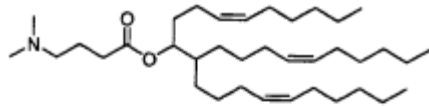
Compuesto 14,



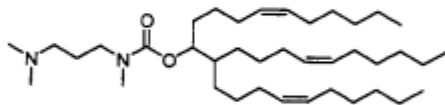
Compuesto 19,



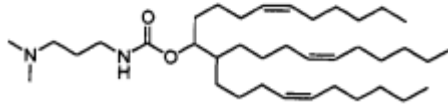
Compuesto 21,



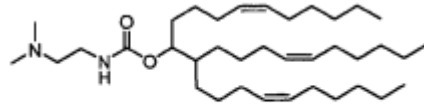
Compuesto 22,



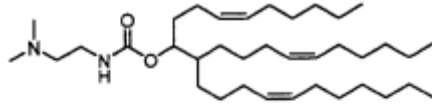
Compuesto 23,



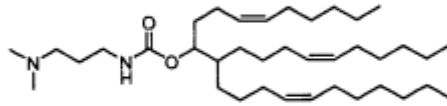
Compuesto 24,



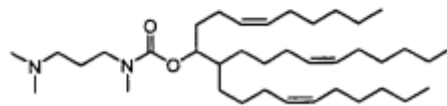
Compuesto 25,



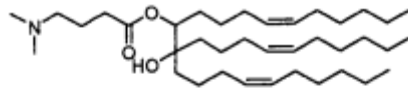
Compuesto 26,



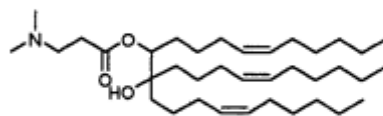
Compuesto 27,



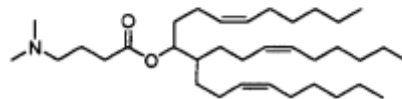
Compuesto 28,



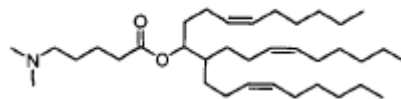
Compuesto 30,



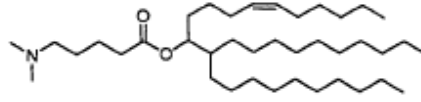
Compuesto 31,



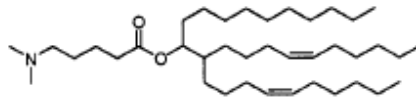
Compuesto 40,



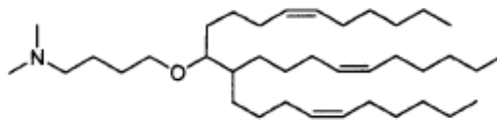
Compuesto 42,



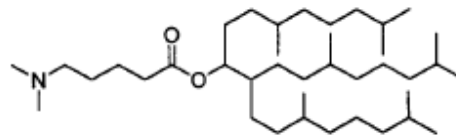
Compuesto 50,



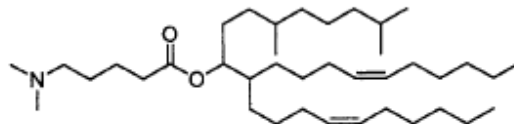
Compuesto 53,



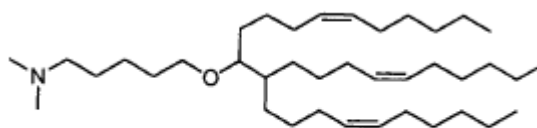
Compuesto 62,



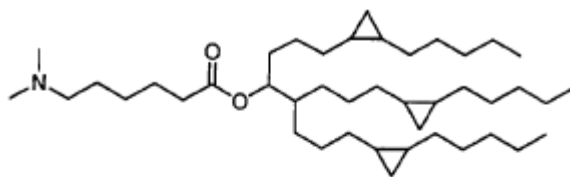
Compuesto 71,



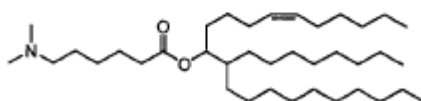
Compuesto 74,



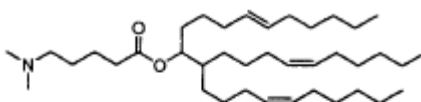
Compuesto 76,



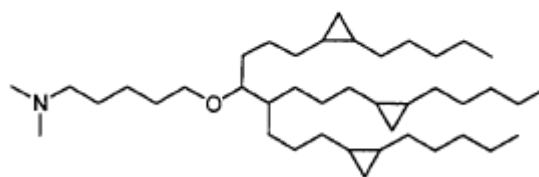
Compuesto 79,



Compuesto 83,



Compuesto 89, y



Compuesto 90.

5. Una partícula lipídica que comprende un lípido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
6. La partícula lipídica de la reivindicación 5, en donde la partícula comprende además un lípido no catiónico, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en un fosfolípido, colesterol o derivado de colesterol, o una mezcla de un fosfolípido y colesterol o derivado de colesterol, en donde el fosfolípido comprende preferiblemente dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), o una de sus mezclas.
7. La partícula lipídica de la reivindicación 5 o reivindicación 6, en donde la partícula comprende además un lípido conjugado que inhibe la agregación de partículas, que comprende preferiblemente un conjugado de polietilenglicol (PEG)-lípido, en donde el conjugado de PEG-lípido comprende preferiblemente un conjugado de PEG-diacilglicerol (PEG-DAG), un conjugado de PEG-dialquilohipropilo (PEG-DAA), o una de sus mezclas.
8. La partícula lipídica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en donde la partícula comprende además un agente terapéutico, en donde el agente terapéutico es preferiblemente un ácido nucleico, en donde el ácido nucleico es preferiblemente ARNm o un ARN interferente, en donde el ARN interferente se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un ARN interferente pequeño (ARNip), un ARN interferente asimétrico (ARNia), un microARN (miARN), un ARNbc sustrato de Dicer, un ARN de horquilla corta (ARNhc), y sus mezclas.
9. La partícula lipídica de la reivindicación 8, en donde el agente terapéutico está completamente encapsulado en la partícula.
10. La partícula lipídica de la reivindicación 8, en donde la partícula tiene una relación en masa de lípido:agente terapéutico de 5:1 a 15:1.
11. La partícula lipídica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la partícula tiene un diámetro mediano de 30 nm a 150 nm.
12. Una composición farmacéutica que comprende una partícula lipídica de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13. Una partícula lipídica de la reivindicación 5 para usar en un método para el suministro in vivo de un agente terapéutico a un mamífero, en donde el mamífero es preferiblemente un ser humano.

5 14. La partícula lipídica para usar de la reivindicación 13, en donde la administración se selecciona del grupo que consiste en oral, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarticular, intralesional, intratraqueal, subcutánea e intradérmica.

15. Una partícula lipídica de la reivindicación 5 para usar en un método para tratar una enfermedad o trastorno, seleccionado del grupo que consiste en una infección vírica, una enfermedad o trastorno hepático y cáncer en un mamífero que lo necesite, en donde el mamífero es preferiblemente un ser humano.