

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 721 325**

51 Int. Cl.:

A61K 9/127 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

B01J 13/02 (2006.01)

B01J 13/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2012 PCT/IB2012/002916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13064911**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2012 E 12829180 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2773326**

54 Título: **Método para producir de manera estéril partículas de lípido-ácido nucleico**

30 Prioridad:

04.11.2011 US 201161556124 P

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

31.07.2019

73 Titular/es:

**NITTO DENKO CORPORATION (100.0%)
1-1-2, Shimohozumi Ibaraki
Osaka 567-8680, JP**

72 Inventor/es:

**KNOPOV, VICTOR;
WITTE, RICHARD, P.;
KARMALI, PRIYA;
LEE, ROBIN y
WEBB, DAVID**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 721 325 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

Método para producir de manera estéril partículas de lípido-ácido nucleico

5 **Campo técnico**

La descripción se refiere a un procedimiento de formación nanopartículas de lípido-ácido nucleico de manera simple y reproducible en condiciones asépticas que comprende el uso de componentes de un solo uso.

10 **Antecedentes**

Los lípidos son potencialmente útiles como portadores para el suministro de moléculas terapéuticas, particularmente para el suministro de ácidos nucleicos. Los lípidos forman liposomas, que pueden encapsular, complejar o atrapar moléculas de ácido nucleico y de ese modo mejorar el suministro de esta clase de moléculas terapéuticas a células diana tras la administración, por ejemplo, por vía intravenosa a la circulación. Su utilidad en las composiciones farmacéuticas está limitada por los métodos disponibles para producir nanopartículas de lípido-ácido nucleico de manera reproducible. Se han ideado diversos métodos para producir tales nanopartículas.

Un método para producir nanopartículas que consisten únicamente en lípidos (vesículas) de manera simple y reproducible sin sonicación utiliza la inyección de etanol descrita por Batzri *et al.*, 1973, *Biophys Biochem Acta* 298: 1015-19 y Kremer *et al.*, 1977, *Biochemistry* 16: 3932-35, por lo que los lípidos solubilizados en etanol se inyectan en una disolución acuosa para formar espontáneamente liposomas.

Van Buitenen *et al.*, documento US 7468151 describen un sistema de circuito cerrado para esterilizar micropartículas, incluyendo liposomas. El sistema de circuito incluye una cámara de mezclado conectada a una unidad de filtración de transfluo (TFF). La unidad de TFF purifica una dispersión líquida de micropartículas en condiciones asépticas. El líquido se bombea asépticamente desde la cámara de mezclado a través de la TFF. El material retenido en la TFF (el retenido) se recicla a través de la cámara de mezclado y la unidad de TFF hasta que se purifica. El proceso de purificación se realiza de manera aséptica en un aparato sin retirar las micropartículas en el retenido de TFF.

Otros describen el proceso de producción de partículas de ácido nucleico-liposoma utilizando métodos específicos para combinar lípidos y ácidos nucleicos. Hirota *et al.*, 1999, *BioTechniques* 27: 286-89, enseñan que se forman espontáneamente liposomas recubiertos con moléculas de ácido nucleico cuando se inyectan lípidos catiónicos en etanol en una disolución acuosa de ácido nucleico. Maurer *et al.*, 2001, *Biophysical J*, 80: 2310-26 y Maurer *et al.* documento US 7094423 enseñan un método de encapsulación de moléculas de ácido nucleico en un liposoma. Este método implica el uso de un liposoma preformado que comprende un lípido catiónico. El liposoma se desestabiliza añadiendo etanol a la disolución acuosa. Se añaden moléculas de ácido nucleico al lípido desestabilizado. Tras la eliminación del etanol, el liposoma encapsula el ácido nucleico mientras se reforma. Un método alternativo para encapsular ácidos nucleicos en liposomas se enseña por Semple *et al.*, 2001, *Biophys Biochem Acta* 1510: 152-66 y Semple *et al.* documento US 6858225. Este método aumenta la eficacia de encapsulación usando un lípido catiónico ionizable para formar liposomas. Una disolución en etanol de lípidos se combina con ácidos nucleicos en una disolución acuosa tamponada a bajo pH. Luego se elimina el etanol mientras se eleva el pH hasta un valor neutro. Ambos métodos requieren un procesamiento adicional de los liposomas resultantes porque la agregación durante la reconstitución produce una amplia variación en el tamaño.

MacLachlan *et al.* US 7901708 describe un proceso y un aparato para producir liposomas de tamaño uniforme que encapsulan un ácido nucleico. Un ARN de corriente en un tampón acuoso se mezcla con una corriente de lípidos catiónicos en etanol a velocidades de flujo aproximadamente iguales en un conector en T, en el que se forman instantáneamente vesículas lipídicas en una alta concentración de etanol (45 %). Las concentraciones de disolvente y soluto se mantienen constantes durante todo el proceso de mezclado. No hay mezcladores estáticos implicados en los que se diluyen los liposomas. Los liposomas de ácido nucleico estables se esterilizan al final del proceso, inmediatamente antes de una etapa de llenado estéril.

El documento WO 2010/045512 A2 describe procesos y composiciones para la administración liposomal de productos terapéuticos preparados poniendo en contacto una disolución acuosa de un agente activo con una disolución de componentes que forman liposomas que contienen uno o más compuestos de aminoácidos DILA2 o lípidos en un disolvente orgánico para formar una corriente de choque. Se utiliza un protocolo que incluye velocidades de flujo, pH y un período de incubación para controlar la formación de componentes liposomales para aplicaciones terapéuticas. La corriente de choque puede recogerse e incubarse para preparar una formulación liposomal que encapsula el agente activo. La composición puede extinguirse con tampón y puede filtrarse por flujo tangencial y diafiltración y otros medios para el acabado como una composición farmacéutica. Se proporciona una eficacia para la administración de una carga de fármaco. Las composiciones pueden incluir un liposoma que contiene una o más partículas portadoras, teniendo cada partícula portadora un agente activo y un péptido, en las que la razón de la masa del péptido más la masa del liposoma con respecto a la masa del agente activo es menor de aproximadamente 15.

Los métodos descritos anteriormente requieren una gran cantidad de trabajo para minimizar la contaminación bacteriana durante el proceso de producción de liposomas, incluyendo tratamiento en autoclave, lavado y cumplimiento de las cargas regulatorias. Sigue habiendo una necesidad no satisfecha de un método de fabricación para encapsular ácidos nucleicos sin la necesidad de etapas de procesamiento mecánico extensivo para preparar liposomas preformados y sin la necesidad de una etapa de procesamiento para reducir partículas de lípido-ácido nucleico a una población monodispersa.

Sumario

La invención se refiere a un método para prepararse de manera estéril una nanopartícula de lípido-ácido nucleico en condiciones asépticas tal como se especifica en la reivindicación 1 adjunta. El sistema que puede usarse en el método de la invención puede comprender además una unidad para preparar la disolución lipídica orgánica conectada a la 1.^a unidad de contención. El sistema que puede usarse en el método de la invención puede comprender además un filtro para esterilizar la disolución lipídica orgánica mientras que dicha disolución está transfiriéndose a la 1.^a unidad de contención. El sistema que puede usarse en el método de la invención comprende una disolución lipídica, disolución de fármaco, mezcla de lípido-fármaco y suspensión que son estériles, tal como se especifica en la reivindicación 1 adjunta. La unidad de concentración puede comprender una bomba dosificadora de diafragma con una cámara de bomba de un solo uso. Los lípidos pueden comprender un lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroles y un conjugado de polietileno (PEG)-lípido, y pueden comprender además un lípido de direccionamiento, tal como se especifica en la reivindicación 2 adjunta. En la realización de la reivindicación 3 adjunta, el fármaco terapéutico es una molécula de ARNbc. La concentración de lípido y ARNbc en la mezcla puede consistir en una razón de carga de lípido:ARN de 2,5. El disolvente orgánico miscible con agua es etanol. Las disoluciones 1.^a y 2.^a pueden combinarse a una temperatura de 35 a 40 °C. La 2.^a unidad de contención puede contener un fármaco terapéutico en un tampón acuoso a de pH 3,5 a pH 4,5. La 3.^a unidad de contención puede contener un tampón acuoso a pH neutro. El diámetro de partícula medio del liposoma que encapsula el fármaco terapéutico puede ser de 80 nm a 150 nm. Los medios de inyección pueden comprender un orificio de inyección que suministra la disolución orgánica a la superficie de contacto de aire-agua de la disolución acuosa en la unidad de mezclado, o alternativamente un orificio de inyección que está sumergido en la disolución acuosa en la unidad de mezclado y suministra la disolución orgánica a la misma. El método puede comprender además una etapa de liofilización. La etapa de liofilización puede comprender una etapa de congelación y una etapa de secado. El tampón acuoso puede comprender sacarosa o trehalosa. La etapa de congelación puede enfriar la mezcla de lípido-fármaco a 1 °C/minuto desde 20 hasta -40 °C. La etapa de secado puede comprender una etapa de secado de la mezcla de lípido-fármaco a de aproximadamente -15 a aproximadamente -35 °C.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un sistema de un solo uso adecuado para su uso en el método de la presente invención.

Descripción detallada de realizaciones ilustrativas

La invención descrita en el presente documento se refiere a un método para prepararse de manera estéril una nanopartícula de lípido-ácido nucleico en condiciones asépticas tal como se especifica en la reivindicación 1 adjunta. El método es particularmente propenso a fabricación a gran escala de partículas que consisten en moléculas terapéuticas encapsuladas en liposomas. El método proporciona el resultado inesperado y sorprendente de que las partículas producidas son monodispersas (es decir, menos de 0,2 de índice de polidispersidad (PDI), tal como se define en el presente documento), y tienen una distribución de tamaño estrecha y uniforme entre 50 y 150 nm. Las partículas producidas mediante el método de la invención no requieren procesamiento mecánico, tal como extrusión, para obtener una población monodispersa.

El método de la invención tiene la ventaja sobre los métodos anteriores de la facilidad con que puede ampliarse hasta grandes volúmenes y es robusto a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, solutos, pH y tiempos de procesamiento.

El método de la invención tiene la ventaja sobre los métodos anteriores de producir de manera reproducible una población uniforme de partículas sin etapas adicionales requeridas para producir vesículas preformadas.

El método de la invención tiene la ventaja sobre los métodos anteriores de producir de manera reproducible una población uniforme de nanopartículas sin etapas adicionales requeridas para procesar mecánicamente partículas producidas a partir de la mezcla lipídica y polímeros de ácido nucleico cargados negativamente. Estas etapas adicionales incluyen, por ejemplo, sonicación, homogeneización o extrusión, para reducir su tamaño y lograr uniformidad en un intervalo terapéuticamente aceptable.

El método de la invención tiene la ventaja de lograr una eficacia de encapsulación de ácido nucleico igual o mejor que los métodos anteriores sin etapas adicionales de procesamiento para producir nanopartículas.

Otras ventajas del método de la invención resultarán evidentes a medida que se proporcionen detalles adicionales en la descripción en el presente documento con respecto a componentes lipídicos y condiciones.

Las siguientes abreviaturas se usan en la descripción.

- 5 VF: filtro de ventilación
- TG: medidor de temperatura
- 10 SUB: lecho de un solo uso
- TFF: filtro de transflujo
- 15 PP: bomba peristáltica
- PG: manómetro
- Balanza: un medio de medición del peso
- 20 La figura 1 muestra un sistema de un solo uso que comprende los siguientes elementos, que puede usarse en una realización del método de la presente invención.
- Reserva de lípidos: este recipiente contiene lípidos seleccionados en un disolvente orgánico miscible con agua, que es etanol. La concentración de lípidos puede ajustarse para aumentar el rendimiento. El recipiente consiste en una
- 25 bolsa desechable con un TG y un medio de mezclado. La bolsa tiene aberturas para añadir lípidos en etanol al 96-100 %, un FV y un tubo de salida, que se controla mediante una válvula. La bolsa se aloja en un contenedor calentable, reutilizable y conectado a tierra. La bolsa tiene un medio para añadir etanol adicional para diluir la disolución lipídica hasta una concentración operativa.
- 30 PP1: bomba peristáltica 1. Esta bombea la reserva de lípidos desde el recipiente de reserva de lípidos a través de un filtro de 0,45/0,22 μm hasta el recipiente de reserva de lípidos filtrados.
- Reserva de lípidos filtrados: este recipiente contiene lípidos a la concentración operativa. El recipiente es una bolsa desechable con un medio de mezclado y un TG. Tiene aberturas para la entrada de la reserva de lípidos, un VF y un
- 35 tubo de salida, que está controlado por una válvula. La bolsa se aloja en un contenedor calentable, reutilizable y conectado a tierra.
- Reserva de ARNip: este recipiente contiene un fármaco seleccionado en un tampón acuoso. ARNip es el fármaco preferido y tampón citrato es el tampón preferido. La concentración puede ajustarse para aumentar el rendimiento. El
- 40 recipiente es una bolsa desechable con un medio de mezclado. La bolsa tiene aberturas para añadir soluto y disolvente, y un tubo de salida, que está controlado por una válvula. La bolsa tiene un medio para añadir un tampón adicional para diluir la solución de ARN hasta una concentración operativa.
- PP2: bomba peristáltica 2. Esta bombea la reserva de ARNip desde el recipiente de reserva de ARNip a través de un
- 45 filtro de 0,45/0,22 μm hasta el recipiente de reserva de ARNip filtrado.
- Reserva de ARNip filtrado: Este recipiente contiene ARNip a concentración operativa. Este elemento contiene una balanza. El recipiente es una bolsa desechable alojada en un recipiente reutilizable. Tiene una(s) abertura(s) para la
- 50 reserva de ARNip y un tubo de salida, que está controlado por una válvula. La bolsa está alojada en un recipiente reutilizable con una balanza.
- PP3: bomba peristáltica 3 para transferir la reserva de lípidos filtrados al recipiente marcado ARNip liposomal en etanol al 35 %. Está equipada con un PG (PG1).
- 55 PP4: bomba peristáltica 4 para transferir la reserva de ARNip filtrado al ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 %. También está equipada con un PG (PG2).
- ARNip liposomal en etanol al 35 %: este recipiente contiene la mezcla de liposomas y fármaco en etanol al 35 %. Este elemento contiene un VF y un TG. Las aberturas para la reserva de ARNip y lípido filtrado están separadas de
- 60 un tubo de salida, que está controlado por una válvula. La unidad preferida es una bolsa desechable alojada en un contenedor reutilizable.
- Tampón fosfato: este recipiente contiene un tampón (preferiblemente un tampón de fosfato), un medio de mezclado y una balanza. Es un recipiente grande con una tapa de apertura y un tubo de salida con una válvula.
- 65 Tampón fosfato filtrado: este recipiente está conectado al recipiente de tampón de fosfato por medio de un tubo, un

ES 2 721 325 T3

filtro de 0,45/0,22 μm y una bomba peristáltica. Tiene un medio de mezclado y un tubo de salida con una válvula que conduce a los tubos a través de PP 5 hasta el ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 10 % y un recipiente con TFF SUB. El recipiente es un contenedor reutilizable revestido con un revestimiento desechable.

5 PP 5: esta bombea el tampón fosfato filtrado desde el recipiente de tampón fosfato filtrado hasta el ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 % y hasta el recipiente con TFF SUB. PP 5 está acoplada a un PG (PG4).

10 ARNip liposomal en etanol al 10 %: este recipiente contiene la mezcla de liposomas y fármaco en etanol al 10 % después de la dilución de los liposomas y el fármaco en etanol al 35 % mediante el tampón en el recipiente de tampón fosfato filtrado. El recipiente es un recipiente reutilizable revestido con un revestimiento desechable, con una entrada para disolución de ARNip liposomal, un FV, una balanza y un orificio de salida con una válvula que conduce al recipiente con TFF SUB.

15 PP 6: esta bombea liposomas y fármaco en etanol al 10 % desde ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 10 % a través de un filtro de 0,45/0,22 μm hasta el recipiente con TFF SUB.

20 TFF SUB: este recipiente contiene orificios de entrada para liposomas y fármaco en etanol al 10 % procedente del ARNip liposomal en recipiente con etanol al 10 %, para el tampón del recipiente de tampón fosfato filtrado y para el retenido de la unidad de TFF, cada uno con una válvula. También contiene un VF y un orificio de salida con su válvula.

Bomba dosificadora con cabezal de bomba desechable: esta bomba de alta presión está acoplada con dos PG (PG 3 y PG 4). Transfiere el liposoma y el fármaco desde TFF SUB hasta la unidad de TFF.

25 TFF: esta unidad se identifica como un par de rectángulos con una línea diagonal. Durante el funcionamiento, el liposoma/fármaco en disolución de etanol pasa a través de la unidad de TFF para eliminar el etanol. El etanol eliminado por la unidad de TFF sale del sistema. Más de una sola TFF pueden funcionar en paralelo, conectadas por válvulas. La disolución retenida (retenido) sale de la TFF, se recircula a la TFF SUB y se recircula a través de la unidad de TFF según sea necesario para eliminar todo el etanol. Un manómetro (PG 4) monitoriza la presión del retenido. Se usa gas nitrógeno almacenado en un tanque de N_2 para aumentar la bomba dosificadora, según sea necesario para crear la contrapresión, y finalmente facilitar la transferencia de retenido de TFF a un primer recipiente SUB de 10 l.

35 SUB de 10 l: este es un recipiente de un solo uso equipado con una balanza. Opcionalmente, el SUB incluye una serie de tres recipientes de SUB de 10 l. El retenido de TFF se bombea a través de un filtro de 0,45/0,22 μm para reducir la carga biológica y garantizar que el producto esté completamente libre de contaminación microbiana resultante de la contaminación microbiana que pueda haber entrado en el flujo de procesamiento. Si el tren de proceso completo es realmente aséptico, entonces puede ser posible omitir las últimas etapas de filtración. El retenido de TFF resultante se empaqueta durante el llenado aséptico.

40 Llenado aséptico: esta etapa precede a la liofilización, que se realiza como un proceso separado con diferentes equipos. La etapa de llenado aséptico antes de la liofilización puede incluir la adición de material portador, tal como manosa, glucosa u otros materiales para proporcionar volumen o para estabilizar el ARN durante la etapa de liofilización.

45 El sistema está dispuesto para el control manual del movimiento de materiales a través de cada etapa. Todos los componentes en contacto con los lípidos, fármacos, disolventes y tampones son de un solo uso y son desechables. El sistema se muestra para un lote de 10 litros y puede aumentarse hasta más de 1000 litros. Los componentes están diseñados para ser utilizados una vez por lote de liposoma/fármaco.

50 Los medios para llevar a cabo el proceso de fabricación según una realización de la presente invención se encuentran en una secuencia de etapas tal como se muestra en un diagrama de flujo (figura 1) tal como sigue.

55 Se preparan por separado disoluciones de reserva de lípidos y fármacos en recipientes de reserva de lípidos y reserva de ARNip. Las soluciones de reserva pueden prepararse a alta concentración. El mezclado se produce agitando en los recipientes de reserva. La temperatura de la disolución de reserva de lípidos puede ajustarse a una temperatura establecida. El recipiente utilizado para preparar la reserva de lípidos se elige para que tenga un material lixiviable mínimo cuando se usa disolvente orgánico puro a una temperatura elevada.

60 Las disoluciones de reserva se bombean por separado a través de un filtro de 0,45/0,22 μm a un recipiente de reserva de lípidos filtrados y un recipiente de reserva de ARNip filtrado. Las soluciones de reserva pueden combinarse con más disolvente para diluir la disolución de reserva antes o durante la transferencia a los recipientes de reserva filtrados.

65 De la misma manera, se prepara tampón acuoso en el recipiente de tampón fosfato y se esteriliza por filtración bombeando a un recipiente de tampón de fosfato filtrado.

La disolución de ARNip filtrada se bombea al ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 %.

5 El lípido en el disolvente orgánico se bombea a la disolución de ARNip acuosa en el ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 % a una velocidad eficaz para formar partículas de lípido-fármaco en una concentración final de etanol al 35 % a una temperatura de ajuste controlada mientras se mezcla la disolución acuosa.

10 La adición de lípidos puede producirse a través de un solo orificio o múltiples orificios, a través de una aguja o un conjunto de agujas. Puede producirse desde arriba hasta la superficie de la disolución acuosa, o puede inyectarse en la solución acuosa desde debajo de la superficie. A través de la adición y el mezclado, la concentración de etanol de la solución en el ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 % aumenta hasta del 30 % al 40 %, preferiblemente el 35 %. El aumento es gradual, formando un gradiente desde valores iniciales (preferiblemente el 0 %) hasta finales (preferiblemente el 35 %) de etanol al 25-45 %. Este gradiente puede prolongarse desde 1 minuto hasta 60 minutos o más, es decir, hasta 100 minutos.

15 Una vez que la disolución del ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 % alcanza una concentración final de etanol (preferiblemente al 35 %), la disolución se extrae por bombeo del ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 35 % y se mezcla en línea con el tampón bombeado por separado del recipiente de tampón de fosfato filtrado para diluir la mezcla en un alcohol miscible con agua, preferiblemente etanol a del 10 % al 20 %, lo más preferiblemente etanol al 10 %, y se transfiere al ARNip liposomal en un recipiente con etanol al 10 %.

La disolución de etanol al 10 % se somete a diafiltración frente al tampón acuoso para eliminar el etanol.

25 El retenido de TFF (0 % de etanol, 100 % de tampón acuoso) se almacena en el primer SUB de 10 l.

El retenido de TFF puede filtrarse opcionalmente para reducir la carga biológica para el llenado aséptico.

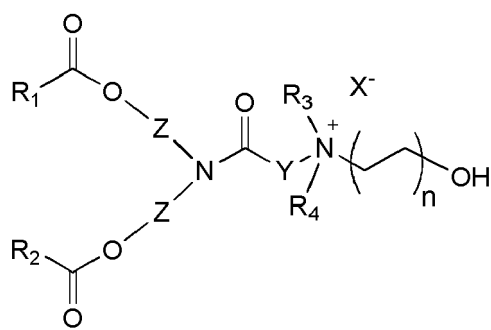
30 El llenado aséptico incluye una etapa de liofilización. La etapa de liofilización es discontinua con el proceso de generación del retenido de TFF estéril en la etapa 10. Es decir, esta etapa se realiza preferiblemente en una ubicación diferente a la unidad de SUB que proporciona el retenido de TFF. Un hidrato de carbono tal como sacarosa o glucosa puede añadirse posiblemente antes de la liofilización para estabilizar las nanopartículas y/o añadir volumen.

35 La mezcla lipídica utilizada en una realización del método de la invención contiene al menos un lípido cargado positivamente (lípido catiónico) para complejarse con los polímeros terapéuticos cargados negativamente, y un conjugado lipídico que contiene polietilenglicol (PEG-lípido) para evitar la agregación. El lípido catiónico puede ser una carga catiónica permanente a lo largo de un amplio intervalo de condiciones de pH, un lípido catiónico ionizable, que está cargado a un pH bajo (menos de pH 6) y sin una carga neta a un pH neutro (pH de 6,5 a 8), o una combinación de lípidos catiónicos permanentes e ionizables. La mezcla lipídica también puede contener un lípido de direccionamiento, un polímero, un esteroide, un fosfolípido o un miembro de otro grupo de lípidos, incluyendo una grasa, una cera, una vitamina liposoluble, monoglicérido o diglicérido, acilos grasos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos esfingolípidos, sacarolípidos y policétidos. Este método también puede usarse para la formación de liposomas con solo componentes neutros o cargados negativamente.

45 Preferiblemente, los componentes de la mezcla lipídica pueden seleccionarse de los siguientes grupos.

Lípido catiónico

50 Son adecuados para su uso en el método de la invención lípidos catiónicos de fórmula I



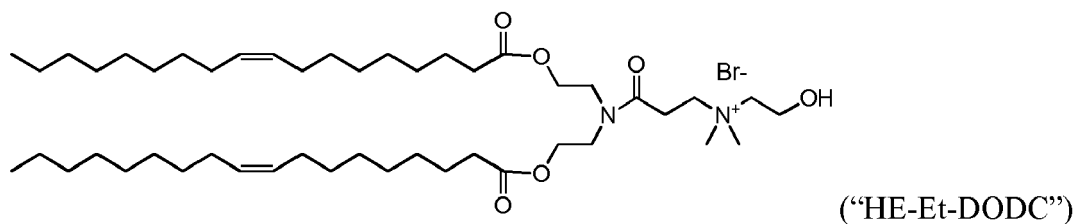
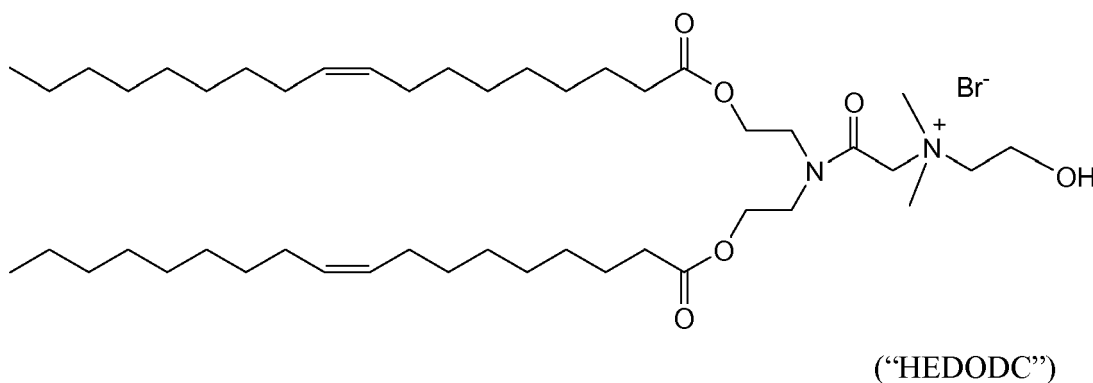
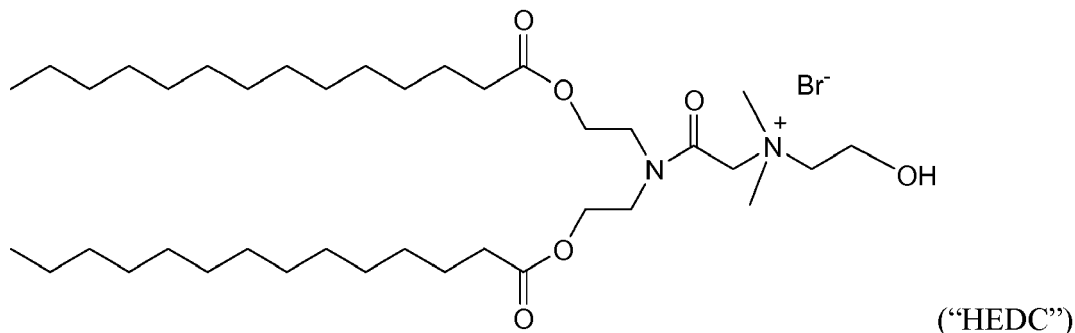
en la que

55 Z = un ligador de alquilo, alquilo C₂-C₄

Y = un ligador de alquilo, alquilo C₁-C₆

R₁ y R₂ son cada uno independientemente alquilo C₁₀-C₃₀, alquenilo C₁₀-C₃₀ o alquinilo C₁₀-C₃₀, alquilo C₁₀-C₃₀, alquilo C₁₀-C₂₀, alquilo C₁₂-C₁₈, alquilo C₁₃-C₁₇, alquilo C₁₃, alquenilo C₁₀-C₃₀, alquenilo C₁₀-C₂₀, alquenilo C₁₂-C₁₈, alquenilo C₁₃-C₁₇, alquenilo C₁₇; R₃ y R₄ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o -CH₂CH₂OH, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₃; n es 1-6; y X es un contraión, incluyendo cualquier contraión de nitrógeno, tal como ese término se entiende fácilmente en la técnica. Los contraiones de nitrógeno preferidos incluyen halógenos, prefiriéndose particularmente cloruro y bromuro. Otro contraión preferido es mesilato (-SO₃CH₃).

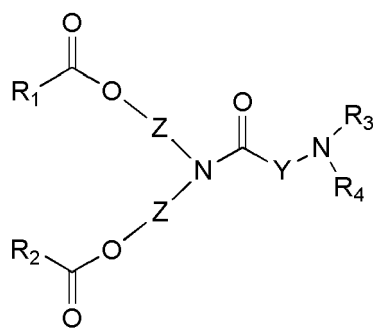
Los compuestos de fórmula I a modo de ejemplo incluyen:



Otros lípidos cargados catiónicos a pH fisiológico incluyen cloruro de *N,N*-dioleil-*N,N*-dimetilamonio ("DODAC"); cloruro de *N*-(2,3-dioleiloxy)propil)-*N,N,N*-trimetilamonio ("DOTMA"); bromuro de *N,N*-diestearil-*N,N*-dimetilamonio ("DDAB"); cloruro de *N*-(2,3-dioleiloxy)propil)-*N,N,N*-trimetilamonio ("DOTAP"); bromuro de *N*-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-*N,N*-dimetil-*N*-hidroxiethylamonio ("DMRIE"), 3β-(*N,N'*-dimetilaminoetano)carbamoil)colesterol ("DC-Chol"), dioctadecilamidoglicilocarboxiespermidina ("DOGS"); y trifluoroacetato de *N*-(1-(2,3-dioleiloxy)propil)-*N*-(2-(esperminacarboxamido)etil)-*N,N*-dimetilamonio ("DOSPA").

Lípidos catiónicos ionizables.

Son adecuados para su uso en el método de la invención lípidos catiónicos ionizables de fórmula II



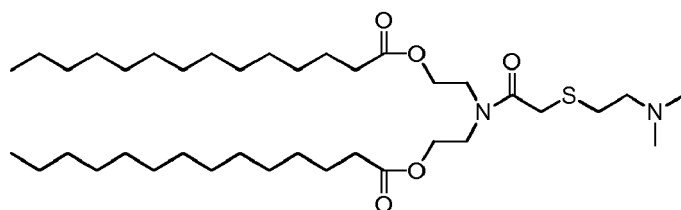
en la que

5 Z = un ligador de alquilo, alquilo C₂-C₄, -CH₂SCH₂CH₂-

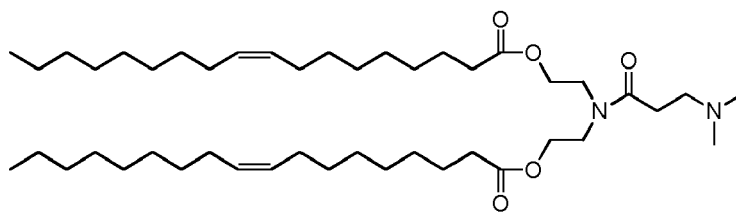
Y = un ligador de alquilo, alquilo C₁-C₆

10 R₁ y R₂ son cada uno independientemente alquilo C₁₀-C₃₀, alquenilo C₁₀-C₃₀ o alquinilo C₁₀-C₃₀, alquilo C₁₀-C₃₀, alquilo C₁₀-C₂₀, alquilo C₁₂-C₁₈, alquilo C₁₃-C₁₇, alquilo C₁₃, alquenilo C₁₀-C₃₀, alquenilo C₁₀-C₂₀, alquenilo C₁₂-C₁₈, alquenilo C₁₃-C₁₇, alquenilo C₁₇; R₃ y R₄ son cada uno independientemente hidrógeno, alquilo C₁-C₆ o -CH₂CH₂OH, alquilo C₁-C₆, alquilo C₁-C₃.

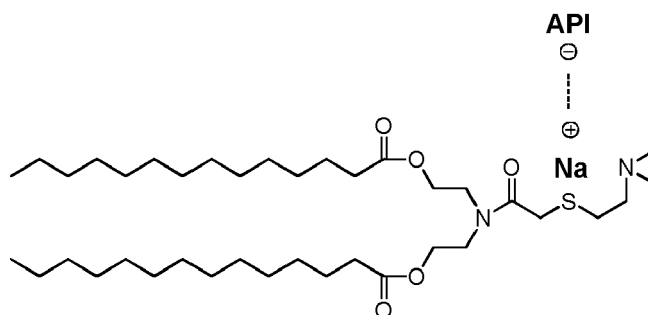
15 Algunos lípidos cargados positivamente tienen una pKa en o cerca del pH fisiológico y son catiónicos en condiciones de ácido débil y débilmente catiónicos a pH fisiológico. Tales lípidos catiónicos ionizables incluyen ditetradecanoato de ((2-((2-(dimetilamino)etil)tio)acetil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) ("S104"), dioleato de (Z)-((3-(dimetilamino)propanoil)azanodiil)bis(etano-2,1-diilo) ("i-Et-DODC"), cloruro de *N*-(2,3-dioleiloxi)propil)*N,N*-dimetilamonio ("DODMA") y 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano ("DODAP").



20



25 Se reconoce que lípidos ionizables pueden facilitar la unión y/o liberación del principio farmacéutico activo (API), tal como se muestra a continuación.



30 Lípidos neutros

Los ejemplos de lípidos neutros incluyen fosfolípidos, aminolípidos y esfingolípidos. Los lípidos neutros incluyen

lípidos anfipáticos. Los ejemplos representativos de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, ácido fosfatídico, palmitoiloleoilfosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, dipalmitoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, diestearoilfosfatidilcolina o dilinoleoilfosfatidilcolina. Otros compuestos carentes de fósforo, tales como familias de esfingolípidos, glicoesfingolípidos, diacilgliceroles y 3-aciloxiácidos, están también dentro del grupo designado como lípidos anfipáticos. Adicionalmente, el lípido anfipático descrito anteriormente puede mezclarse con otros lípidos incluyendo triglicéridos y esteroides.

PEG-lípidos

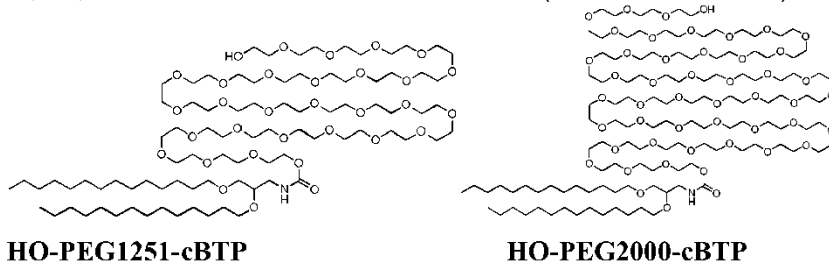
Un componente estabilizador de la bicapa es polietilenglicol ("PEG") conjugado con un grupo de cabeza lipídico, por ejemplo, fosfatidiletanolamina. Otro componente estabilizador de la bicapa es PEG conjugado con una ceramida. El PEG puede conjugarse con una fosfatidiletanolamina o, alternativamente, con una ceramida usando reacciones de acoplamiento convencionales conocidas y usadas por los expertos en la técnica. Además, están disponibles comercialmente conjugados de PEG-fosfatidiletanolamina ("PEG-PE") preformados.

Pueden usarse PEG de pesos moleculares variables para formar los componentes estabilizadores de la bicapa de la presente invención. Están disponibles comercialmente PEG de pesos moleculares variables de varias fuentes diferentes o, alternativamente, pueden sintetizarse usando técnicas de polimerización convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica. En una realización actualmente preferida, el polietilenglicol tiene un peso molecular que oscila entre 200 y 10 000 Da, preferiblemente entre 500 y 4000 Da, y lo más preferiblemente entre 1000 y 2000 Da. En general, se ha encontrado que aumentar el peso molecular del PEG reduce la concentración del componente estabilizador de bicapa requerido para lograr la estabilización.

La fosfatidiletanolamina que tiene una variedad de grupos de cadena de acilo de longitudes de cadena y grados de saturación variables puede conjugarse con PEG para formar el componente estabilizador de la bicapa. Tales fosfatidiletanolaminas están disponibles comercialmente, o pueden aislarse o sintetizarse usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica. Se prefieren fosfatidiletanolaminas que contienen ácidos grasos saturados o insaturados con longitudes de cadenas de carbono en el intervalo de C₁₀ a C₂₀. También pueden usarse fosfatidiletanolaminas con ácidos grasos mono o diinsaturados y mezclas de ácidos grasos saturados e insaturados. Fosfatidiletanolaminas adecuadas incluyen las siguientes: dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) y diestearofosfatidil-etanolamina (DSPE).

Las composiciones anteriores también pueden incluir lípidos conjugados con PEG, que se conocen en la técnica *per se*, incluyendo PEG-fosfolípidos y PEG-ceramidas, incluyendo una o más moléculas seleccionadas de las siguientes: PEG2000-DSPE, PEG2000-DPPE, PEG2000-DMPE, PEG2000-DOPE, PEG1000-DSPE, PEG1000-DPPE, PEG1000-DMPE, PEG1000-DOPE, PEG550-DSPE, PEG550-DPPE, PEG-550DMPE, PEG-1000DOPE, PEG-colesterol, PEG2000-ceramida, PEG1000-ceramida, PEG750-ceramida y PEG550-ceramida.

Además, las composiciones también pueden incluir peg-lípidos monodispersos (md), con fórmula general mdPEG-ligador-lípido, incluyendo los ejemplos (2,3-bis (tetradeciloxi)propil)carbamato de 83-hidroxi-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81-heptacosaoxatrioctacontilo ("HO-PEG1251-cBTP") y (2,3-bis(tetradeciloxi)propil)carbamato de 134-hidroxi-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57,60,63,66,69,72,75,78,81,84,87,90,93,96,99,102,105,108,111,114,117,120,123,126,129,132-tetratetracontaoxatetriacontahectilo ("HO-PEG2000-cBTP") como ejemplos



Esteroides

Los esteroides incluyen colestanos (por ejemplo, colesterol), colanos y ácidos biliares (por ejemplo, quenodesoxicolato y colato), ergosterol, lanosterol, corticosteroides (por ejemplo, glucocorticoide), pregnano (por ejemplo, progesterona) y fitoesteroides. Estos pueden incluirse también en forma de un conjugado con un resto hidrófilo, por ejemplo, un polietilenglicol. Un esteroide preferido es el colesterol.

Lípidos de direccionamiento

Un ejemplo de un lípido de direccionamiento es un compuesto de fórmula (A),



5 en el que el lípido (L) se selecciona del grupo que consiste en DSPE, DOPE y DC; el ligador (X) se selecciona del grupo que consiste en nada, PEG550, PEG2000, PEG-glutamato (-Glu), Glu, C6, glicina y GluNH, N1,N19-bis (3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida; y el retinoide (R) se selecciona del grupo que consiste en tretinoína, adapaleno, retinol, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR), ácido retinoico (vitamina A), ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,2,6-trimetilciclohexil)nonanoico, y cualquier retinoide parcial o totalmente saturado o un derivado del mismo.

Otro ejemplo de un lípido de direccionamiento es un compuesto de fórmula (B),



en la que el ligador (X) es N1,N19-bis(3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida ("bisamido-PEG") o N1,N19-bis(16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida ("lys-bisamido-PEG-lys"); y el retinoide (R) se selecciona del grupo que consiste en tretinoína, adapaleno, retinol, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR) y ácido retinoico (vitamina A), ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,2,6-trimetilciclohexil)nonanoico, y cualquier retinoide parcial o totalmente saturado o un derivado del mismo.

Otras moléculas de direccionamiento pueden incluirse en la mezcla lipídica, por ejemplo, ácido fólico, vitamina E, ligandos peptídicos y/o anticuerpos monoclonales.

Composiciones y formulaciones de partículas de ARN-lípido

El método de la invención produce composiciones que comprenden una partícula lipídica con un agente activo de ácido nucleico, en el que el agente activo cuando está presente está asociado con la partícula lipídica. En realizaciones particulares del método de la invención, se obtienen composiciones en las que el agente activo de ácido nucleico está encapsulado dentro de un interior acuoso de la partícula lipídica. En otras realizaciones del método de la invención, se obtienen composiciones en las que el agente activo de ácido nucleico está presente dentro de una o más capas lipídicas de la partícula lipídica. En otras realizaciones del método de la invención, se obtienen composiciones en las que el agente activo de ácido nucleico está unido a la superficie lipídica exterior o interior de una partícula lipídica.

En el método de la presente invención, se obtienen partículas lipídicas, que están asociadas con un ácido nucleico, dando como resultado una partícula de ácido nucleico-lípido. En realizaciones particulares del método de la presente invención, se obtienen partículas en las que el ácido nucleico está completamente encapsulado en la partícula lipídica. Tal como se usa en el presente documento, el término "ácido nucleico" pretende incluir cualquier oligonucleótido de ARN o polinucleótido de ARN. Los fragmentos que contienen hasta 50 nucleótidos generalmente se denominan oligonucleótidos, y los fragmentos más largos se llaman polinucleótidos. En realizaciones particulares del método de la presente invención, se usan oligonucleótidos que tienen una longitud de 15-50 nucleótidos.

Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" en el presente documento se refieren a un polímero u oligómero de monómeros de nucleótidos o nucleósidos que consisten en bases, azúcares y enlaces entre azúcares (estructura principal) que se producen de manera natural. Los términos "polinucleótido" y "oligonucleótido" también incluyen polímeros u oligómeros que comprenden monómeros que no se producen de manera natural, o porciones de los mismos, que funcionan de manera similar. Tales oligonucleótidos modificados o sustituidos se prefieren a menudo con respecto a formas nativas debido a propiedades tales como, por ejemplo, captación celular mejorada y estabilidad aumentada en presencia de nucleasas. En la presente invención, se emplean "polinucleótidos" y "oligonucleótidos" del tipo de ARN.

Los oligonucleótidos empleados en la presente invención son, por tanto, oligorribonucleótidos. Un oligodesoxirribonucleótido consiste en una desoxirribosa unida covalentemente a fosfato en los carbonos 5' y 3' de este azúcar para formar un polímero alterno, no ramificado. Un oligorribonucleótido consiste en una estructura de repetición similar en la que cada nucleótido tiene un grupo de azúcar ribosa. Pueden incluirse moléculas de ribosa modificadas en un oligorribonucleótido.

El ácido nucleico que está presente en una partícula de lípido-ácido nucleico obtenida según esta invención incluye cualquier forma de ácido nucleico de ARN que se conozca. Los ácidos nucleicos usados en el presente documento pueden ser ARN monocatenario, o ARN bicatenario, o híbridos de ADN-ARN o híbridos de ARN-PNA de dúplex de PNA. Los ejemplos de ARN bicatenario incluyen ARNip y otros reactivos de interferencia de ARN. Los ácidos nucleicos monocatenarios incluyen, por ejemplo, oligonucleótidos antisentido, ribozimas, microARN y oligonucleótidos que forman tríplex.

Los ácidos nucleicos pueden ser de diversas longitudes, generalmente dependientes de la forma particular de ácido nucleico. Por ejemplo, en realizaciones particulares, los plásmidos o genes pueden oscilar entre aproximadamente 1,000 y 100,000 residuos de nucleótidos de longitud. En realizaciones particulares, los oligonucleótidos pueden oscilar entre aproximadamente 10 y 100 nucleótidos de longitud. En diversas realizaciones relacionadas, los oligonucleótidos, ya sean monocatenarios, bicatenarios y de cadena triple, pueden oscilar en longitud entre aproximadamente 10 y aproximadamente 50 nucleótidos, entre aproximadamente 21 y aproximadamente 50 nucleótidos, entre aproximadamente 15 y aproximadamente 30 nucleótidos, entre aproximadamente 20 y aproximadamente 30 nucleótidos de longitud.

En realizaciones particulares, el método de la invención puede usar un oligonucleótido (o una hebra del mismo) que puede hibridarse específicamente o es complementario a un polinucleótido diana. "Que puede hibridarse específicamente" y "complementario" son términos que se usan para indicar un grado suficiente de complementariedad de manera que se produzca 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 el 100 % complementario a su secuencia de ácido nucleico diana para que pueda hibridarse específicamente. Un oligonucleótido puede hibridarse específicamente cuando la unión del oligonucleótido a la diana interfiere con la función normal de la molécula diana para provocar una pérdida de utilidad o expresión del mismo, y existe un grado suficiente de apareamiento de bases específico para evitar la unión no específica del oligonucleótido a secuencias no diana en condiciones en las que se desea una unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico o, en el caso de ensayos *in vitro*, en condiciones en las que se realizan los ensayos. Por tanto, en otras realizaciones, este oligonucleótido incluye sustituciones de 1, 2 o 3 bases en comparación con la región de una secuencia de gen o ARNm a la que se dirige o con la que hibrida específicamente.

En realizaciones particulares, el método de la invención puede producir partículas de ácido nucleico-lípido que pueden estar asociadas con moléculas de interferencia de ARN (iARN). Pueden usarse métodos de interferencia de ARN que usan moléculas de iARN para interrumpir la expresión de un gen o polinucleótido de interés. Los ARNip son dúplex de ARN que normalmente tienen una longitud de 15-30 nucleótidos que pueden asociarse con un complejo multiproteico citoplásmico conocido como complejo de silenciamiento inducido por iARN (RISC). RISC cargado con ARNip media en la degradación de transcritos de ARNm homólogos; por tanto, puede diseñarse un ARNip para desactivar la expresión de proteínas con alta especificidad. A diferencia de otras tecnologías antisentido, el ARNip funciona a través de un mecanismo natural evolucionado para controlar la expresión génica a través de ARN no codificante. En general, se considera que esta es la razón por la que su actividad es más potente *in vitro* e *in vivo* que cualquier oligonucleótido antisentido o ribozima. Los reactivos de ARNi pueden incluir híbridos de ADN sentido:ARN antisentido, híbridos de ARN sentido:ADN antisentido. Por tanto, pueden usarse moléculas de iARN que comprenden cualquiera de estos tipos diferentes de moléculas bicatenarias. Además, se entiende que pueden usarse moléculas de iARN e introducirse en células de una variedad de formas. En consecuencia, tal como se usa en el presente documento, las moléculas de iARN abarcan todas y cada una de las moléculas capaces de inducir una respuesta de iARN en células, incluyendo polinucleótidos bicatenarios que comprenden dos hebras separadas, es decir, una hebra sentido y una hebra antisentido, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño (ARNip); polinucleótidos que comprenden un bucle de horquilla de secuencias complementarias, que forman una región bicatenaria, por ejemplo, moléculas de iARNhc, y vectores de expresión que expresan uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido bicatenario solo o en combinación con otro polinucleótido.

Puede usarse interferencia de ARN (iARN) para inhibir específicamente la expresión de polinucleótidos diana. La supresión mediada por ARN bicatenario de la expresión de genes y ácidos nucleicos puede lograrse según la invención mediante la introducción de ARNbc, ARNip o ARNhc en células u organismos. El ARNip puede ser ARN bicatenario, o una molécula híbrida que comprende tanto ARN como ADN, por ejemplo, una hebra de ARN y una hebra de ADN, o ARNipip.

Pueden prepararse fácilmente moléculas de iARN que seleccionan como diana polinucleótidos específicos según procedimientos conocidos en la técnica. Por consiguiente, un experto en la técnica entendería que puede usarse una amplia variedad de moléculas de ARNip diferentes para seleccionar como diana un gen o transcrito específico. En determinadas realizaciones, las moléculas de ARNip según la invención son bicatenarias y tienen una longitud de 16-30 ó 18-25 nucleótidos, incluyendo cada número entero entre ellos.

En general, las moléculas de ARNip son completamente complementarias a una hebra de una molécula de ADN diana. En otras realizaciones, los ARNip pueden tener una composición modificada, tal como, por ejemplo, modificaciones de 2'-desoxi o 2'-O-metilo. Sin embargo, en realizaciones preferidas, la hebra completa del ARNip no está hecha ni con bases modificadas con 2'-deoxi ni con 2'-O.

En determinadas realizaciones, la presente invención se refiere a métodos para producir partículas de ácido nucleico encapsuladas en lípidos en las que los ácidos nucleicos están encapsulados dentro de una capa lipídica. Tales partículas de ácido nucleico-lípido, que incorporan oligonucleótidos de ARNip, se caracterizan usando una variedad de parámetros biofísicos que incluyen: (1) razón de ácido nucleico con respecto a lípido; (2) eficacia de encapsulación; y (3) tamaño de partícula. Son deseables una alta eficacia de encapsulación, buena resistencia a

nucleasas y estabilidad en suero y tamaño de partícula controlable, generalmente de menos de 200 nm de diámetro. Además, la naturaleza del polímero de ácido nucleico es importante, ya que la modificación de los ácidos nucleicos en un esfuerzo por conferir resistencia a nucleasas se suma al coste del producto terapéutico, mientras que en muchos casos proporciona solo una resistencia limitada. A menos que se indique lo contrario, estos criterios se calculan en esta memoria descriptiva de la siguiente manera:

La razón de ácido nucleico con respecto a lípido es la cantidad de ácido nucleico en un volumen definido de preparación dividido entre la cantidad de lípido en el mismo volumen. Esto puede expresarse como una base mol por mol o en una base peso por peso, o en una base peso por mol. Para las formulaciones finales, listas para la administración, la razón de ácido nucleico:lípido se calcula después de que se haya empleado diálisis, cromatografía y/o digestión enzimática (por ejemplo, nucleasa) para eliminar la mayor cantidad posible del ácido nucleico externo.

Encapsulación

Para determinar la eficacia de encapsulación de ARNip (EE), expresada como porcentaje de ARNip encapsulado en partículas de ácido nucleico-lípido, se utiliza un ensayo de RiboGreen de la siguiente manera. El procedimiento puede usarse para determinar la concentración de ARN o ADN dúplex y monocatenario en disolución.

El equipo incluye pipetas variables de BioTek Instruments, Inc. FLx800, y un mezclador de vórtex. Los reactivos incluyen agua libre de ARNasa (grado MilliQ o equivalente), tampón TE 20x "libre de ARNasa" (Invitrogen, T11493 o equivalente), reactivo RiboGreen Quant-iT (Invitrogen, R11491) y Triton X-100 al 10 % en agua (Thermo Scientific, 28314, o equivalente).

La preparación del tampón 1X TE implica la transferencia de 38 ml de agua libre de ARNasa a un tubo de centrifuga de 50 ml utilizando un cilindro graduado de 50 ml; y el pipeteo de 2 ml de disolución tampón 20X TE en el tubo de centrifuga y mezclar usando un agitador de vórtex.

La preparación de Triton X-100 al 2 % y Triton X-100 al 1 % en tampón 1X TE implica pipetear 2 ml o 1 ml, respectivamente, de Triton X-100 al 10 % en un tubo cónico de 15 ml libre de ARNasa, añadir 8 ml o 9 ml, respectivamente, de tampón 1X TE y agitar para mezclar bien.

La preparación de una disolución de trabajo de RiboGreen implica retirar una reserva congelada de reactivo RiboGreen calentando a temperatura ambiente y diluir 1:200 con tampón TE. El tubo de la centrifuga se envuelve en papel de aluminio para evitar que cualquier luz en exceso llegue a la disolución.

Se prepara un patrón preparando una disolución de ARN en tampón TE y colocándola en una placa de 96 pocillos. Las muestras se diluyen hasta una concentración final de aproximadamente 80 µg/ml de ARNip y se transfieren a la placa de 96 pocillos tal como se muestra en la figura 1. La disolución de trabajo de RiboGreen se añade y se mezcla con cada muestra y patrón. Las muestras se incuban en la oscuridad durante 1-2 minutos antes de analizarlas.

Se añade entonces Triton X-100 al 1 % en tampón TE a las muestras duplicadas y se añade luego la disolución de trabajo de RiboGreen.

La eficacia de encapsulación se determina a partir de las mediciones de fluorescencia usando el promedio de los resultados de fluorescencia de cada muestra, corregido para las mediciones de nivel inicial del promedio de muestras externas (fluorescencia del reactivo de RiboGreen en ausencia de ARN) y después de corregir una reducción del 8 % en la intensidad de la señal debido a la presencia de Triton X-100. La eficacia de encapsulación se calcula entonces usando la siguiente ecuación:

$$EE = (\text{muestra de Triton} - \text{muestra de liposomas}) / (\text{muestra de Triton})$$

Es decir, la eficacia de encapsulación es la diferencia entre el valor de ARN total (medido después de disolver el liposoma con detergente) y el valor de liposoma intacto, dividido entre el valor de ARN total. La fluorescencia obtenida de la muestra de liposomas intactos consistirá en ARN libre en solución más el ARN absorbido en la superficie exterior del liposoma.

Tamaño

El tamaño indica el tamaño (diámetro) de las partículas formadas. La distribución de tamaño puede determinarse usando un instrumento de dispersión de luz dinámica (DLS) Malvern Zetasizer Nano-ZS.

Este procedimiento se aplica a la medición del diámetro medio en volumen, el diámetro promedio Z y la polidispersidad para muestras de liposomas en proceso. La polidispersidad es un valor numérico para la distribución de tamaño de partícula.

Las mediciones se realizan a temperatura ambiente. Las muestras y los reactivos deben equilibrarse a temperatura

ambiente. Se determina el diámetro de partícula medio ponderado en volumen y el índice de polidispersidad.

Método de fabricación

5 *Preparación de liposomas*

La mezcla lipídica se solubiliza en un disolvente orgánico miscible con agua, que es etanol y preferiblemente etanol absoluto. En la mayoría de las realizaciones, el disolvente orgánico etanol se usa en la forma en que está disponible comercialmente.

10 En una realización a modo de ejemplo del método de la presente invención, se usa una mezcla lipídica, en el que la mezcla lipídica es una mezcla de aminolípidos catiónicos, lípidos neutros (distintos de un aminolípido), un esteroide (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-S-DMG, PEG-C-DOMG o PEGDMA) se solubilizan conjuntamente en el disolvente orgánico. En realizaciones preferidas, la mezcla lipídica consiste esencialmente en un aminolípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG. En realizaciones preferidas adicionales, la mezcla lipídica consiste en un lípido catiónico, DOPE (u otro lípido auxiliar, o bien con una carga catiónica ionizable o bien permanente), colesterol y lípido conjugado con PEG a varias razones molares. Intervalos molares preferidos están entre el 40 y el 60 % en moles de lípido catiónico, el 10 y el 30 % de lípidos neutros, el 20 y el 40 % de colesterol y el 1 y el 10 % de lípidos modificados con PEG.

20 Puede añadirse un lípido de direccionamiento a la mezcla lipídica, por ejemplo, diVA-PEG750-diVA (u otro lípido de direccionamiento conjugado con VA) a una razón molar de 0,1 a 5 (lípido de direccionamiento:lípido total).

25 La concentración total de lípidos es inferior a 25 mg/ml, preferiblemente inferior a 5 mg/ml. La mezcla lipídica se filtra a través de una membrana, por ejemplo un filtro de 0,45 o 0,2 μm .

30 Según una realización del método de la invención, la mezcla lipídica se combina con una disolución acuosa tamponada. La disolución acuosa tamponada puede ser una disolución en la que el tampón tiene un pH menor que el pKa de un lípido protonado en la mezcla lipídica. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen citrato, fosfato y acetato. Un tampón particularmente preferido es tampón de citrato. Los tampones preferidos estarán en el intervalo de concentración de 1-1000 mM del anión, dependiendo de la química del ácido nucleico que está encapsulándose, y la optimización de la concentración del tampón puede ser significativa para lograr altos niveles de carga. Puede ser adecuado añadir un crioprotector y/o un soluto no iónico, que equilibrará el potencial osmótico a través de la membrana de la partícula, por ejemplo, cuando las partículas se dializan para eliminar el etanol, aumentar el pH o se mezclan con un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable. La cantidad de ácido nucleico en el tampón es de desde aproximadamente 0,08 hasta 0,8 mg/ml.

40 En el momento de la adición de etanol en una realización del método de la invención, la temperatura de la disolución acuosa es de 25 °C a 45 °C, preferiblemente de 30 °C a 40 °C. La disolución de etanol se añade a la disolución acuosa o bien por pulverización sobre la superficie de contacto aire-agua, en una corriente estrecha, o bien a través de una superficie de contacto líquido-líquido entre el etanol suministrado a través de un tubo que se sumerge en la disolución acuosa.

45 La disolución orgánica se añade por gravedad o por una bomba que suministra la disolución orgánica a la disolución acuosa a una velocidad controlada, preferiblemente una velocidad constante. El suministro de la disolución orgánica se completa en de 1 minuto a 100 minutos, preferiblemente en de 1 a 25 minutos. La disolución orgánica puede añadirse a través de una sola pulverización o corriente, a través de un tubo o boquilla, o a través de un sistema de múltiples boquillas. Mientras que la disolución orgánica se añade a la solución acuosa, la disolución resultante puede mezclarse agitando, removiendo o recirculando. La etapa de adición da como resultado una concentración final que es del 25 al 45 % de etanol, lo más preferiblemente el 35 % de etanol.

50 La disolución final se trata para eliminar el disolvente orgánico, mediante diálisis o filtración, preferiblemente mediante diafiltración. Mientras se elimina el etanol, la solución acuosa se convierte en una disolución tamponada a un pH neutro, de pH 6,8 a pH 7,5, preferiblemente, pH 7,2, por ejemplo un tampón fosfato o HEPES. La disolución acuosa resultante se esteriliza preferiblemente antes del almacenamiento o uso, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de 0,22 μm .

Liposomas que encapsulan polímeros terapéuticos cargados negativamente

60 Los métodos de la invención son útiles para preparar partículas lipídicas con un polímero de ácido nucleico terapéutico cargado negativamente, es decir, una molécula de ARN. En los métodos descritos en el presente documento, se combina una mezcla lipídica con una solución acuosa del polímero de ácido nucleico. El polímero se encapsula eficazmente en las partículas lipídicas resultantes.

65 Las nanopartículas pueden incluir un agente terapéutico o agente activo polianiónico, es decir, un ARN y uno, dos o tres polímeros biocompatibles. Los agentes terapéuticos son ácidos nucleicos.

La carga total del polímero cargado negativamente debe ser menor que o igual al número de cargas positivas en la mezcla lipídica en el momento de la adición, preferiblemente de 0,06 a 0,16 (p:p). Es decir, los ácidos nucleicos encapsulados están presentes en una razón final de ARN:lípido de 0,06 a 0,16, carga:carga (-/+), preferiblemente de 1:2,5 a 1:1.

Cuando la mezcla lipídica comprende un lípido catiónico con una carga, pueden formarse vesículas lipídicas en presencia de un polímero de ácido nucleico cargado negativamente para encapsular y atrapar el polímero. Las partículas resultantes pueden neutralizarse aumentando el pH del medio a un pH fisiológico o superior. Las vesículas formadas de esta manera proporcionan formulaciones de tamaño de vesícula uniforme con alto contenido de ácidos nucleicos.

En cualquier caso, las vesículas que encapsulan el polímero (nanopartículas) tienen un intervalo de tamaño de 50 a 150 nm.

Según el método de una realización de la invención, la mezcla lipídica se combina con una disolución acuosa tamponada que puede contener el polímero de ácido nucleico cargado negativamente. La disolución acuosa tamponada puede ser una disolución en la que el tampón tiene un pH menor que el pKa de un lípido protonado en la mezcla lipídica. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato y MES. Un tampón particularmente preferido es el tampón citrato. Los tampones preferidos estarán en el intervalo de 1-1000 mM del anión, dependiendo de la química del polímero que está encapsulándose, y la optimización de la concentración del tampón puede ser importante para lograr altos niveles de carga.

Puede ser adecuado añadir un crioprotector y/o un soluto no iónico que equilibrará el potencial osmótico a través de la membrana de la partícula cuando las partículas se dializan para eliminar el etanol, aumentar el pH o mezclarse con un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

Para el ARN, en la figura 1 se representa un esquema del procedimiento descrito en el presente documento como una realización del método de la invención. Se preparan disoluciones mediante la disolución de material liofilizado o sólido en agua, preferiblemente tamponada a pH 3,5-4,5, por ejemplo con citrato 50 mM. La cantidad de ácido nucleico en el tampón es de 0,08 a 0,8 mg/ml. En el momento de la adición de etanol, la temperatura de la disolución acuosa es de 25 °C a 45 °C, preferiblemente de 30 °C a 40 °C. Si se usa ácido nucleico monocatenario, puede ser útil calentar brevemente a temperatura elevada, por ejemplo, 1-2 minutos a 65 °C.

La disolución de etanol se agrega a la disolución acuosa o bien pulverizando la superficie de contacto aire-agua, en una corriente estrecha, o bien a través de una superficie de contacto líquido-líquido entre el etanol suministrado a través de un tubo que se conecta a un recipiente con la disolución acuosa.

La disolución orgánica se añade suministrando la disolución orgánica a la disolución acuosa a una velocidad controlada, preferiblemente a una velocidad constante. El suministro de la disolución orgánica se completa en de 1 minuto a 100 minutos, preferiblemente en de 1 a 25 minutos. La disolución orgánica puede añadirse a través de una sola pulverización o corriente, a través de un tubo o boquilla, o a través de un sistema de múltiples boquillas. Mientras que la disolución orgánica se añade a la disolución acuosa, la disolución resultante puede mezclarse agitando, removiendo o recirculando. La etapa de adición da como resultado una concentración final suficiente para romper la estructura de la bicapa liposomal, concretamente etanol a del 25 al 45 %, más preferiblemente etanol al 35 %.

Para partículas de lípido-ácido nucleico obtenidas por el método de la presente invención, la concentración final de ARN es de 0,001 a 1 mg/ml, preferiblemente de 0,01 a 0,5 mg/ml, lo más preferiblemente de 0,05 a 0,5 mg/ml. La razón final de fármaco/lípido es de 0,06 a 0,16 p:p (de 2,5:1 a 1:1, razón carga/carga).

La disolución final se trata para eliminar el disolvente orgánico, mediante diálisis o filtración, preferiblemente mediante diafiltración. Mientras se elimina el etanol, la disolución acuosa se convierte en una disolución tamponada a un pH neutro, de pH 6,8 a pH 7,5, preferiblemente, pH 7,2, por ejemplo un tampón fosfato. La disolución acuosa resultante se esteriliza preferiblemente antes del almacenamiento o uso, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

La eficacia de encapsulación final es mayor del 85 %. El diámetro de partícula medio final es de 50 a 150 nm. El índice de polidispersidad PDI es menor de 0,2, preferiblemente menor de 0,1.

Liofilización

La presente divulgación se refiere en parte a una composición farmacéutica liofilizada que, cuando se reconstituye, tiene una cantidad mínima de agregados grandes. Tales composiciones farmacéuticas liofilizadas no son realizaciones de la presente invención. Tales agregados grandes pueden tener un tamaño mayor de aproximadamente 0,2 µm, mayor de aproximadamente 0,5 µm o mayor de aproximadamente 1 µm, y pueden no

desearse en una disolución reconstituida. Los tamaños de los agregados pueden medirse usando una variedad de técnicas, incluyendo las indicadas en la Farmacopea de los Estados Unidos 32<788>. Las pruebas pueden incluir una prueba de recuento de partículas de oscurecimiento de la luz, prueba de recuento de partículas microscópicas, difracción láser y detección óptica de partículas individuales. En una realización, el tamaño de partícula en una muestra dada se mide usando difracción láser y/o detección óptica de partículas individuales. Puede usarse dispersión dinámica de la luz (DLS) para medir el tamaño de partícula, pero se basa en movimiento browniano, de modo que la técnica puede no detectar algunas partículas más grandes. La difracción láser se basa en diferencias en el índice de refracción entre la partícula y los medios de suspensión. La técnica es capaz de detectar partículas en el intervalo de submicrométrico a milimétrico. Pueden determinarse cantidades relativamente pequeñas (por ejemplo, aproximadamente el 1-5 % en peso) de partículas más grandes en suspensiones de nanopartículas. La detección óptica de partículas individuales (SPOS) usa el ligero oscurecimiento de suspensiones diluidas para contar partículas individuales de aproximadamente 0,5 µm. Al conocer la concentración de partículas de la muestra medida, puede calcularse el porcentaje en peso de agregados o la concentración de agregados (partículas/ml).

Puede producirse formación de agregados durante las etapas de congelación y/o secado de la liofilización, por ejemplo, debido a la deshidratación de la superficie de las partículas. El proceso de congelación tiene un efecto de concentración que puede reducir la distancia entre las partículas a medida que se forma hielo (Alison *et al.*, *Biochim Biophys Acta*. 29 de septiembre de 2000; 1468 (1-2): 127-38; Armstrong y Anchordoquy, *J Pharm Sci*. noviembre de 2004; 93 (11): 2698-709). Esta deshidratación se puede evitar utilizando lioprotectores, tales como polisacáridos, en la suspensión antes de la liofilización. Los polisacáridos adecuados incluyen sacarosa, lactulosa, lactosa, maltosa, trehalosa, o celobiosa, kojibiosa, nigerosa, isomaltosa, trehalosa, soforosa, laminaribiosa, gentibiosa, turanosa, maltulosa, palatinosa, gentiobiulosa, manobiosa, melibiosa, melibiulosa, rutinosa, rutinulosa y xilobiosa. En una realización, la composición comprende un polisacárido que es sacarosa. En otra realización, la composición comprende un polisacárido que es trehalosa. Los resultados de los solicitantes muestran, en comparación con la suspensión de partida, que se obtienen distribuciones de tamaño de DLS equivalentes tras la reconstitución.

Anteriormente se pensaba que la vitrificación, el proceso de inmovilización de macromoléculas en un excipiente vítreo, no era un factor contribuyente en la prevención de la agregación de liposomas y que se requerían disoluciones hipertónicas de azúcar (Alison *et al.*). Los presentes inventores encontraron que los resultados de las etapas de congelación y secado de la liofilización dependen de una determinada razón de lípido:polisacárido (p:p), que proporciona un medio para prevenir esa agregación de liposomas, la ruptura de la barrera de difusión liposomal y la liberación de ARN encapsulado para formar lipoplexos de ácidos nucleicos. En una realización de la presente divulgación, que no es una realización de la invención reivindicada, la composición comprende del 12 al 15 % (p:p) de sacarosa y de 5 a 20 mg/ml de lípido, preferiblemente el 12 % de sacarosa y 9 mg/ml de lípido. Más preferiblemente, la composición también comprende un tampón, más preferiblemente HEPES a un pH neutro.

Se llevan a cabo etapas de liofilización en un recipiente de vidrio adecuado, preferiblemente un vial de vidrio cilíndrico de 10 ml. El vial de vidrio debe soportar cambios extremos en las temperaturas de menos de -40 °C y superiores a la temperatura ambiente en cortos períodos de tiempo, y cortarse de una forma uniforme. La composición que comprende el agente de carga y los liposomas que encapsulan el ácido nucleico se añade al vial, preferiblemente en un volumen de 3 ml, y preferiblemente con 9 mg/ml de lípido.

La etapa de liofilización puede comprender congelar la composición a una temperatura superior a aproximadamente -40 °C, o por ejemplo inferior a aproximadamente -30 °C, formando una composición congelada; y secar la composición congelada para formar la composición liofilizada. La etapa de congelación da como resultado preferiblemente una disminución lineal de la temperatura hasta la final a lo largo de aproximadamente 6 minutos, preferiblemente a 1 °C/minuto desde 20 hasta -40 °C. Más preferiblemente, puede usarse sacarosa al 12-15 %, y la etapa de secado es a aproximadamente 50-150 mTorr, en primer lugar a una temperatura baja de aproximadamente -15 a aproximadamente -35 °C, y luego a una temperatura más alta de temperatura ambiente a aproximadamente 25 °C, y se completa en de tres a siete días. En otra realización de la presente divulgación, puede usarse trehalosa, y la etapa de secado es a aproximadamente 50-100 mTorr, en primer lugar a una temperatura baja de aproximadamente 0 a aproximadamente -15 °C, y luego a la temperatura más alta.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método de prevención de la agregación sustancial de partículas en una composición farmacéutica de nanopartículas que comprende añadir un azúcar y una sal a la formulación liofilizada para prevenir la agregación y liberación de ácido nucleico desde el interior del liposoma. Este aspecto tampoco es una realización de la invención reivindicada.

Composiciones farmacéuticas

Las partículas lipídicas que pueden obtenerse mediante el método de la presente invención, que están asociadas con un agente terapéutico de ácido nucleico, pueden formularse como una composición farmacéutica, por ejemplo, que comprende además un diluyente, excipiente o portador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina fisiológica o tampón fosfato, seleccionado según la vía de administración y la práctica farmacéutica convencional. Estas composiciones farmacéuticas no se reivindican como realizaciones de la presente invención.

En realizaciones particulares, se preparan composiciones farmacéuticas que comprenden las partículas de lípido-ácido nucleico obtenidas mediante el método de la invención según técnicas convencionales y comprenden además un portador farmacéuticamente aceptable. Generalmente, se empleará solución salina normal como portador farmacéuticamente aceptable. Otros portadores adecuados incluyen, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina al 0,9 %, glicina al 0,3 %, un azúcar o polisacárido, por ejemplo, sacarosa y/o trehalosa, incluyendo glicoproteínas para lograr una estabilidad potenciada, tales como albúmina, lipoproteína, globulina. Pueden incluirse agentes de carga, crioprotectores y/o lioprotectores, así como eliminadores de metales, por ejemplo, EDTA. En composiciones que comprenden solución salina u otros portadores que contienen sal, el portador se añade preferiblemente tras la formación de partículas lipídicas. Por tanto, tras formarse las composiciones de lípido-ácido nucleico, las composiciones pueden diluirse en portadores farmacéuticamente aceptables tales como solución salina normal.

Las preparaciones farmacéuticas resultantes pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, bien conocidas. Las disoluciones acuosas pueden envasarse o filtrarse entonces en condiciones asépticas y liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una disolución acuosa estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, etc. Adicionalmente, la suspensión lipídica puede incluir agentes protectores de lípidos que protegen a los lípidos frente a los daños peroxidativos de lípidos y radicales libres en almacenamiento. Son adecuados extintores de radicales libres lipófilos, tales como α -tocoferol y quelantes específicos de hierro solubles en agua, tales como ferrioxamina.

La concentración de partícula lipídica o partícula de lípido-ácido nucleico en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, desde menos de aproximadamente el 0,01 %, habitualmente a o al menos aproximadamente el 0,05-5 % hasta tanto como del 10 al 30 % en peso y se seleccionará principalmente mediante los volúmenes, viscosidades, etc., de fluidos según el modo particular de administración seleccionado. Por ejemplo, la concentración puede aumentarse para disminuir la carga de fluido asociada con el tratamiento. Esto puede ser particularmente deseable en pacientes que tienen insuficiencia cardiaca congestiva asociada a aterosclerosis o hipertensión grave. Alternativamente, pueden diluirse complejos compuestos por lípidos irritantes hasta concentraciones bajas para disminuir la inflamación en el sitio de administración. En un grupo de realizaciones, el ácido nucleico tendrá un marcador unido y se usará para diagnóstico (indicando la presencia de ácido nucleico complementario). En este caso, la cantidad de complejos administrados dependerá del marcador particular usado, el estado patológico que está diagnosticándose y el criterio del médico, pero estará generalmente entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, preferiblemente entre aproximadamente 0,001 y aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal.

Método de uso

Las partículas lipídicas obtenidas por el método de la invención pueden usarse para administrar un ácido nucleico a una célula, *in vitro* o *in vivo*. Dichos usos no son realizaciones de la invención reivindicada. Si bien la siguiente descripción de diversos métodos de uso de las partículas lipídicas y composiciones farmacéuticas relacionadas se ejemplifican mediante una descripción relacionada con las partículas de ácido nucleico-lípido, se entiende que estos métodos y composiciones pueden adaptarse fácilmente para la administración de cualquier agente terapéutico para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno que se beneficiaría de tal tratamiento.

En el presente documento también se describen, pero no como realizaciones de la invención reivindicada, métodos para introducir un ácido nucleico en una célula. Ácidos nucleicos preferidos para la introducción en células son ARNip, oligonucleótidos inmunoestimulantes, plásmidos, antisentido y ribozimas. Estos métodos pueden llevarse a cabo poniendo en contacto las partículas o composiciones obtenidas mediante el método de la presente invención con las células durante un período de tiempo suficiente para que se produzca la administración intracelular.

Las composiciones obtenidas por el método de la presente invención pueden adsorberse a casi cualquier tipo de célula. Una vez adsorbidas, las partículas de ácido nucleico-lípido pueden o bien experimentar endocitosis por una porción de las células, o bien intercambiar lípidos con las membranas celulares o bien fusionarse con las células. La transferencia o incorporación de la porción de ácido nucleico del complejo puede tener lugar a través de una cualquiera de estas vías. Se cree que en el caso de partículas captadas en la célula por endocitosis, las partículas interaccionan con la membrana endosomal, dando como resultado la desestabilización de la membrana endosomal, posiblemente por la formación de fases no bicapa, dando como resultado la introducción del ácido nucleico encapsulado en el citoplasma celular. De manera similar, en el caso de la fusión directa de las partículas con la membrana plasmática celular, cuando tiene lugar la fusión, la membrana del liposoma se integra en la membrana celular y el contenido del liposoma se combina con el fluido intracelular. El contacto entre las células y las composiciones de lípido-ácido nucleico, cuando se lleva a cabo *in vitro*, tendrá lugar en un medio biológicamente compatible. La concentración de composiciones puede variar ampliamente dependiendo de la aplicación particular, pero generalmente está entre 1 μ mol y 10 mmol. En determinadas realizaciones, el tratamiento de las células con las composiciones de lípido-ácido nucleico generalmente se llevará a cabo a temperaturas fisiológicas (37 °C) durante

períodos de tiempo de desde 1 hasta 24 horas, preferiblemente desde 2 hasta 8 horas. Para aplicaciones *in vitro*, la administración de ácidos nucleicos puede ser a cualquier célula hecha crecer en cultivo, ya sea de origen vegetal o animal, vertebrado o invertebrado, y de cualquier tejido o tipo. Las células pueden ser células animales, específicamente células de mamíferos, y más específicamente células humanas.

Puede añadirse una suspensión de partículas de lípido-ácido nucleico a células sembradas en placa confluentes al 60-80 % que tienen una densidad celular de desde aproximadamente 10^3 hasta aproximadamente 10^5 células/ml, más preferiblemente alrededor de 2×10^4 células/ml. La concentración de la suspensión añadida a las células es preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 20 $\mu\text{g/ml}$, más preferiblemente de aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$.

Las aplicaciones típicas incluyen el uso de procedimientos bien conocidos para proporcionar la administración intracelular de ARNip para desactivar o silenciar dianas celulares específicas. Las aplicaciones alternativas incluyen la administración de secuencias de ADN o ARNm que codifican polipéptidos terapéuticamente útiles. Estas aplicaciones no son realizaciones de la invención reivindicada.

Los métodos descritos en el presente documento, que no son realizaciones de la invención reivindicada, pueden ponerse en práctica *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. Por ejemplo, las composiciones obtenidas por los métodos de la presente invención también pueden usarse para administrar ácidos nucleicos a células *in vivo*, usando métodos que conocen los expertos en la técnica.

Para la administración *in vivo*, las composiciones farmacéuticas se administran preferiblemente por vía parenteral, es decir, por vía intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. En realizaciones particulares, las composiciones farmacéuticas se administran por vía intravenosa o intraperitoneal mediante una inyección en bolo.

En otros métodos descritos en el presente documento, que no son realizaciones de la invención reivindicada, las preparaciones farmacéuticas pueden ponerse en contacto con el tejido diana mediante la aplicación directa de la preparación al tejido. La aplicación puede realizarse mediante procedimientos tópicos, "abiertos" o "cerrados". Por "tópico" se entiende la aplicación directa de la preparación farmacéutica a un tejido expuesto al medio ambiente, como la piel, la orofaringe y el canal auditivo externo. Los procedimientos "abiertos" son aquellos procedimientos que incluyen hacer una incisión en la piel de un paciente y visualizar directamente el tejido subyacente al que se aplican las preparaciones farmacéuticas. Esto generalmente se logra mediante un procedimiento quirúrgico, como una toracotomía para acceder a los pulmones, una laparotomía abdominal para acceder a las vísceras abdominales u otro enfoque quirúrgico directo del tejido diana. Los procedimientos "cerrados" son procedimientos invasivos en los que los tejidos internos no se visualizan directamente, sino que se accede a través de instrumentos de inserción a través de pequeñas heridas en la piel. Por ejemplo, las preparaciones pueden administrarse al peritoneo mediante lavado con aguja. Del mismo modo, las preparaciones farmacéuticas pueden administrarse a las meninges o la médula espinal mediante infusión durante una punción lumbar seguida de una colocación adecuada del paciente tal como se pone en práctica comúnmente para la anestesia espinal o la obtención de imágenes con metrazamida de la médula espinal. Alternativamente, las preparaciones pueden administrarse a través de dispositivos endoscópicos.

Las composiciones de lípido-ácido nucleico obtenidas por el método de la invención también pueden administrarse en un aerosol inhalado en los pulmones o por inyección directa en el sitio de la enfermedad.

Los métodos de la presente divulgación, que no son realizaciones de la invención reivindicada, pueden ponerse en práctica en una variedad de sujetos o huéspedes. Los sujetos o huéspedes preferidos incluyen especies de mamíferos, tales como seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, ganado y caballos, ovejas. El sujeto puede ser un mamífero, tal como un ser humano, que necesita tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, un sujeto diagnosticado o considerado en riesgo de una enfermedad o trastorno.

Las dosificaciones para las partículas de agente terapéutico lipídico obtenidas por el método de la presente invención dependerán de la razón de agente terapéutico con respecto a lípido y de la opinión del médico administrador basada en la edad, el peso y el estado del paciente.

En una realización, la presente divulgación proporciona un método, que no es una realización de la invención reivindicada, de modulación de la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Estos métodos comprenden generalmente poner en contacto una célula con una partícula lipídica de la presente invención que está asociada con un ácido nucleico capaz de modular la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. Tal como se usa en el presente documento, el término "modulación" se refiere a alterar la expresión de un polinucleótido o polipéptido diana. En diferentes realizaciones, modular puede significar aumentar o mejorar, o puede significar disminuir o reducir. Los métodos de medición del nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana se conocen y están disponibles en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos que emplean reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) y técnicas inmunohistoquímicas. En realizaciones particulares, el nivel de expresión de un polinucleótido o polipéptido diana aumenta o se reduce en al menos el 10 %, el 20 %, el 30 %, el 40 %, el 50 % o más del 50 % en comparación con un valor de control apropiado.

5 Por ejemplo, si se desea aumentar la expresión de un polipéptido, el ácido nucleico puede ser un vector de expresión que incluye un polinucleótido que codifica el polipéptido deseado. Por otro lado, si se desea una expresión reducida de un polinucleótido o polipéptido, entonces el ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un oligonucleótido antisentido, ARNip o microARN que comprende una secuencia de polinucleótido que se hibrida específicamente con un polinucleótido que codifica el polipéptido diana, interrumpiendo de ese modo la expresión del polinucleótido o polipéptido diana. Alternativamente, el ácido nucleico puede ser un plásmido que expresa dicho oligonucleótido antisentido, ARNip o microARN.

10 El agente activo o agente terapéutico de ácido nucleico puede seleccionarse de un ARNip, un microARN, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microARN o un oligonucleótido antisentido, y en el que el ARNip, microARN o ARN antisentido comprende un oligonucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo, de manera que se reduce la expresión del polipéptido.

15 El ácido nucleico puede ser, alternativamente, un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo, de manera que aumenta la expresión del polipéptido o la variante funcional o fragmento del mismo.

20 En realizaciones relacionadas, la presente divulgación proporciona un método, que no es una realización de la invención reivindicada, para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por la sobreexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica de la presente invención, en el que el agente terapéutico se selecciona de un ARNip, un microRNA, un oligonucleótido antisentido y un plásmido capaz de expresar un ARNip, un microRNA o un oligonucleótido antisentido, y en el que el ARNip, microRNA o ARN antisentido comprende un oligonucleótido que se une específicamente a un polinucleótido que codifica el polipéptido, o un complemento del mismo.

25 En otra realización relacionada, la presente divulgación incluye un método, que no es una realización de la invención reivindicada, para tratar una enfermedad o trastorno caracterizado por la infraexpresión de un polipéptido en un sujeto, que comprende proporcionar al sujeto una composición farmacéutica de la presente invención, en el que el agente terapéutico es un plásmido que codifica el polipéptido o una variante funcional o fragmento del mismo.

Ejemplos

Ejemplo 1 (ejemplo de referencia)

35 Se prepararon nanopartículas de liposoma/ARN y nanopartículas de lípido solo mediante referencia a la figura 1 a diversas escalas que oscilan entre 20 l y 200 l usando 2 ARNip diferentes.

40 Se mezcló una disolución lipídica de reserva de la siguiente manera. Todos los componentes lipídicos (lípido catiónico, DOPE, colesterol, lípidos conjugados con PEG y diVA-PEG750-diVA) se disolvieron en etanol absoluto hasta una concentración en peso de 4,5 mg/ml. Los lípidos en etanol se elevaron hasta 35 °C a 40 °C y se mezclaron hasta que se disolvieron visiblemente.

45 Se bombeó la disolución lipídica desde el recipiente de lípidos de reserva a través de un filtro de 0,45/0,22 µm hasta un recipiente de reserva de lípidos filtrados.

50 Se solubilizó el ARNip en tampón citrato 50 mM en un recipiente de reserva de ARNip a una concentración de 0,26 mg/ml o 0,16 mg/ml dependiendo de la razón final de ARNip con respecto a lípido. Se bombeó la disolución de ARNip desde el recipiente de reserva de ARNip a través de un filtro de 0,45/0,22 µm a un recipiente de ARNip liposomal en etanol al 35 %.

55 El ARNip liposomal en etanol al 35 % se llevó a de 35 °C a 40 °C mientras se agitaba continuamente el contenido. Se pulverizó la disolución lipídica sobre la superficie del tampón que contenía ARNip usando una boquilla para formar espontáneamente liposomas cargados con ARNip. Los lípidos se combinaron con ARNip para alcanzar una razón final de lípido total con respecto a ARNip de 14:1 o 9:1 (peso:peso) y una concentración de etanol del 35 %.

60 Entonces se diluyó la disolución de liposomas con tampón PBS filtrado por 0,22 µm en una bolsa de un solo uso Flex Boy de 20 litros hasta una concentración final de etanol de aproximadamente el 10 %. La disolución de liposomas resultante se concentró y luego se sometió a diafiltración frente a volúmenes de 10x de PBS para eliminar el etanol e intercambiar el tampón. Se llevaron a cabo las etapas de concentración y diafiltración completas utilizando una bomba Quattro Flow (diafragma) montada con una cámara de bomba de un solo uso, tubos flexibles de un solo uso y cartuchos de membrana de fibra hueca de un solo uso. La suspensión final se filtró a través de un filtro de 0,45/0,22 µm para la reducción de la carga biológica en una botella de recogida final de un solo uso. Los resultados se muestran en la tabla 1.

65

Tabla 1

Vol. de lote [l]	Substancia farmacológica	Lípido:fármaco [p/p]	Tamaño de partícula		EE [%]	Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
			Media [nm]	PDI		
20	ARNip 1	14:1	79,6	0,144	95 %	>90 %
20	Liposomas vacíos (sin ARNip)	n/A	78,1	0,129	n/A	>90 %
20	ARNip 2	9:1	88,8	0,156	92 %	>90 %
50	ARNip 2	14:1	80,2	0,146	94 %	>90 %
120	Liposomas vacíos (sin ARNip)	n/A	79,1	0,107	n/A	>90 %
120	ARNip 2	9:1	89,9	0,138	92 %	>90 %
200	ARNip 1	14:1	89,1	0,154	94 %	>90 %
200	ARNip 2	14:1	83,7	0,143	94 %	>90 %

Preparación de liposomas

- 5 En una realización a modo de ejemplo, la mezcla lipídica es una mezcla de aminolípidos catiónicos, lípidos neutros (distintos de un aminolípido), un esteroide (por ejemplo, colesterol) y un lípido modificado con PEG (por ejemplo, un PEG-S-DMG), PEG-C-DOMG o PEGDMA) se solubilizan conjuntamente en el disolvente orgánico, que es etanol. En realizaciones preferidas, la mezcla lipídica consiste esencialmente en un aminolípido catiónico, un lípido neutro, colesterol y un lípido modificado con PEG. En otras realizaciones preferidas, la mezcla lipídica consiste en un lípido catiónico, DOPE (u otro lípido auxiliar, con una carga catiónica o bien ionizable o bien permanente), colesterol y lípido conjugado con PEG a varias razones molares. Intervalos molares preferidos están entre el 40 y el 60 % en moles de lípido catiónico, el 10 y el 30 % de lípidos neutros, el 20 y el 40 % de colesterol y el 1 y el 10 % de lípidos modificados con PEG. Puede añadirse un lípido de direccionamiento a la mezcla lipídica, por ejemplo, diVA-PEG750-diVA (u otro lípido de direccionamiento conjugado con VA) a una razón molar de 0,1 a 5 (lípido de direccionamiento: lípido total). La mezcla lipídica también puede incluir una mezcla de polímeros o auxiliares de procesamiento que pueden ser de origen natural (por ejemplo, quitosano) o sintético (por ejemplo, PEI). La concentración total de lípidos es inferior a 25 mg/ml, preferiblemente inferior a 5 mg/ml. La mezcla lipídica se filtra a través de una membrana, por ejemplo un filtro de 0,45 o 0,2 μm .
- 10
- 15
- 20 Según esta realización de la invención, la mezcla lipídica se combina con una disolución acuosa de ácido nucleico tamponada. La disolución acuosa tamponada puede ser una disolución en la que el tampón tiene un pH menor que el pKa de un lípido protonable en la mezcla lipídica. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen citrato, fosfato, acetato y MES. Un tampón particularmente preferido es el tampón citrato. Los tampones preferidos estarán en el intervalo de concentración de 1-1000 mM del anión, dependiendo de la química del ácido nucleico que está encapsulándose, y la optimización de la concentración del tampón puede ser significativa para lograr altos niveles de carga. Alternativamente, puede usarse agua pura acidificada a pH 5-6 con HCl, H₂SO₄, o similares. Puede ser adecuado para un soluto no iónico que equilibrará el potencial osmótico a través de la membrana de la partícula, por ejemplo, cuando las partículas se dializan para eliminar el etanol, aumentar el pH o mezclarse con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como solución salina normal. El tampón también puede incluir auxiliares de procesamiento (por ejemplo, poloxámeros, surfactantes, detergentes), agentes de carga (por ejemplo, manitol) o crioprotectores (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, galactosa, inulina). La cantidad de ácido nucleico en el tampón es de desde aproximadamente 0,08 hasta 0,8 mg/ml.
- 25
- 30
- 35 En el momento de la adición de etanol, la temperatura de la disolución acuosa y el etanol es de 25 °C a 45 °C, preferiblemente de 30 °C a 40 °C. La disolución de etanol se añade a la disolución acuosa a través de una superficie de contacto líquido-líquido y el etanol se administra a través de un tubo o una boquilla que se sumerge en la disolución acuosa.
- 40 La disolución orgánica se añade mediante una bomba que suministra la disolución orgánica a la disolución acuosa a una velocidad controlada, preferiblemente a una velocidad constante. El suministro de la disolución orgánica se completa en de 1 minuto a 100 minutos, preferiblemente en de 2 a 20 minutos. La disolución orgánica puede añadirse a través de un solo orificio o boquilla, o a través de un sistema de múltiples orificios o boquillas. El diámetro de orificio de la única boquilla (o matriz de múltiples boquillas) puede ser de desde 10 hasta 1000 μm , preferiblemente desde 300 hasta 600 μm . La adición puede realizarse aplicando de desde 0 hasta 30 psi a la corriente orgánica para ayudar en la dispersión. Mientras que la disolución orgánica se añade a la disolución acuosa, la disolución resultante se mezcla agitando o recirculando. La etapa de adición da como resultado una concentración final que es del 25 al 45 % de etanol, lo más preferiblemente el 35 % de etanol.
- 45
- 50 La disolución final se trata para eliminar el disolvente orgánico, mediante diálisis o preferiblemente mediante diafiltración. Mientras se elimina el etanol, la disolución acuosa se convierte en una disolución tamponada a un pH neutro, de pH 6,8 a pH 7,5, preferiblemente, pH 7,2, por ejemplo un tampón fosfato. El tampón también puede incluir

auxiliares de procesamiento (por ejemplo, poloxámeros, surfactantes, detergentes), agentes de carga (por ejemplo, manitol) o crioprotectores (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, galactosa, inulina). La disolución acuosa resultante se esteriliza preferiblemente antes del almacenamiento o uso, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de 0,22 μm .

5 Este método de producción de liposomas puede usarse en relación con un colector SUS que comprende un sistema de subunidades SUS. Este sistema de colector puede comprender las siguientes subunidades: una unidad de mezclado de lípidos que consiste en una bolsa de mezclado de lípidos para preparar una disolución de lípidos en un disolvente orgánico miscible con agua, una bolsa de contención de lípidos y un medio de transferencia de la disolución de lípidos desde la unidad de lípidos hasta la unidad de contención de lípidos; una unidad de mezclado de ARN que consiste en una bolsa de mezclado de ARN para preparar una disolución de ARN, una bolsa de contención de ARN y un medio de transferencia de la disolución de ARN desde la unidad de ARN hasta la unidad de contención de ARN; un medio de transferencia de la disolución de lípidos desde la bolsa de contención de lípidos hasta la disolución de ARN; y un sistema de diafiltración que consiste en membranas de fibra hueca, un cabezal de bomba de diafragma de un solo uso y diversas bolsas de contención.

El equipo SUS puede esterilizarse previamente y hacerse funcionar usando conexiones/desconexiones estériles para producir liposomas usando un proceso aséptico. El procesamiento aséptico elimina el requisito de la filtración estéril final (0,22 μm). La ausencia del filtro de 0,22 μm permite procesar un mayor intervalo de tamaños de partícula (>200 nm) y resuelve cualquier posible problema de compatibilidad entre el filtro y el producto farmacológico.

Ejemplo 2: efecto de la concentración sobre el tamaño de partícula de ARN-lípido.

(Ejemplo de referencia)

25 Este ejemplo describe el efecto del ARNip y la concentración de lípidos sobre el tamaño de partícula.

Preparar nanopartículas mediante el método descrito en el presente documento. Se solubilizaron un lípido catiónico, DOPE, colesterol, PEG-BML y diVA-PEG750-diVA en etanol absoluto a una razón molar de 50:10:38:2:5, respectivamente. El ARNip se solubilizó en tampón citrato 50 mM a pH 4,5.

35 Un tampón que contenía ARNip se llevó a 35 °C a 40 °C mientras se agitaba continuamente en un recipiente de mezclado. Entonces se pulverizó la mezcla de etanol/lípido sobre la superficie del tampón que contenía ARNip usando una matriz de múltiples boquillas para formar espontáneamente liposomas cargados con ARNip. Las concentraciones de lípidos y ARN se ajustaron para alcanzar un intervalo de concentración de ARNip final de desde 0,05 hasta 0,5 mg/ml, una razón de fármaco:lípido de 0,08 (peso:peso) y una concentración de etanol del 35 %. La razón de lípido con respecto a ARNip se mantuvo constante para todas las condiciones sometidas a prueba.

40 Se diluyeron los liposomas cargados con ARNip hasta ~10 % de etanol para estabilizar las partículas y luego se sometieron a diafiltración frente a volúmenes 10X de PBS (pH 7,2) para eliminar el etanol e intercambiar el tampón. El producto final se filtró a través de un filtro de PES de 0,22 μm , grado de esterilización, para la reducción de la carga biológica. El volumen, el tamaño de partícula medio y el índice de polidispersidad (PDI) se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS). Los resultados se muestran en la tabla 2.

45 Tabla 2.

ARNip final	Diam. medio en vol. [nm]		
	Media	SD	PDI
0,05	96,7	7,0	0,084
0,10	105,7	10,1	0,073
0,25	116,8	8,4	0,125
0,50	141,9	10,0	0,105

50 Los resultados muestran que el tamaño de partícula aumenta al aumentar la concentración de ARNip (en mg/ml). Reducir las concentraciones de lípidos y ARNip (manteniendo la misma razón relativa) reduce el tamaño de partícula, mientras que aumentar la concentración aumenta el tamaño de partícula. Concentraciones finales de ARNip entre 0,05 y 0,5 mg/ml producen nanopartículas con un diámetro de partícula medio de 96,7 a 141,9 nm, menos de 150 nm, y con un índice de polidispersidad menor de 0,2 en todos los casos.

55 El tamaño de partícula inferior a 150 nm con un PDI inferior a 0,2 se produce mediante el método descrito en el presente documento, sin preparar vesículas lipídicas preformadas vacías y/o sin procesamiento mecánico.

Ejemplo 3: efecto de los parámetros del proceso sobre la formación de partículas de ARN-lípido

(Ejemplo de referencia)

5 Este ejemplo describe el efecto de diversos parámetros del proceso sobre la formación de partículas de ARN-lípido. Se examinaron varios parámetros durante este experimento, incluida la temperatura, la concentración de etanol, el tampón, la razón de lípido:ARNip y el tipo de boquilla usada para dispersar la disolución lipídica.

10 Se disolvieron HEDC, DOPE, colesterol, un PEG-BML y diVA-PEG750-diVA en etanol absoluto a una razón molar de 40:30:25:5:2. El tampón que contenía ARNip se llevó a la temperatura indicada mientras se agitaba continuamente en un recipiente de mezclado. Se pulverizó entonces la mezcla de etanol/lípido sobre la superficie del tampón que contenía ARNip usando una boquilla para formar espontáneamente liposomas cargados con ARNip. Los lípidos se combinaron con ARNip hasta alcanzar una concentración final de ARNip de 0,1 mg/ml a la razón de fármaco/lípido indicada y el porcentaje de etanol final indicado.

15 El ARNip se solubilizó en tampón citrato cuya concentración se varió desde 25 hasta 100 mM y de pH 3,5 a pH 6,5. La temperatura de la mezcla se varió de desde 25 °C hasta 45 °C. La concentración final de etanol se varió de desde el 25 hasta el 45 %. La razón de fármaco:lípido (peso/peso) se varió de desde 0,07 hasta 0,11. El diámetro interno (ID) de la boquilla de hidratación se varió de desde 0,005 hasta 0,125 pulgadas. Cada condición se realizó como una medición para comparar el efecto de cada parámetro del proceso. A menos que se indique, cada
20 condición se realizó con un tampón citrato 50 mM, pH 4,5, 35 °C, etanol final al 35 %, razón de fármaco:lípido de 0,07 y un ID de boquilla de 0,005 pulgadas.

25 Los liposomas cargados con ARNip se diluyeron en etanol al 10 % para estabilizar las partículas y luego se sometieron a diafiltración frente a volúmenes 10X de PBS (pH 7,2) para eliminar el etanol e intercambiar el tampón. El producto final se filtró a través de un filtro de PES de 0,22 µm, grado de esterilización, para la reducción de la carga biológica.

30 La tabla 3 muestra el efecto del pH sobre el diámetro medio y el PDI de las nanopartículas de lípido-ácido nucleico. El aumento del pH del tampón dio como resultado un aumento del tamaño de partícula, aunque menos del tamaño de partícula medio de 150 nm.

Tabla 3

PH del tampón	Diam. medio en vol. [nm]		
	Media	SD	PDI
6,5	130,7	17,7	0,111
4,5	108,5	7,1	0,163
3,5	86,1	10,2	0,149

35 La tabla 4 muestra el efecto de la concentración de tampón sobre diversos parámetros. Los resultados mostraron que el aumento de la concentración de tampón redujo la recuperación de ARNip. El diámetro medio de partícula y el PDI no se vieron afectados. Se observó un tamaño de partícula mínimo para pH 3,5 y se observó una recuperación máxima de ARNip para tampón citrato 25 mM.

40 Tabla 4

Conc. de tampón [mM]	Diam. medio en vol. [nm]				Recuperación de ARNip [%]
	Media	SD	PDI	EE [%]	
25	103,1	13,4	0,179	96	94
50	113,8	15,5	0,156	94	87
100	101,0	9,4	0,185	94	80

45 La tabla 5 muestra que el aumento de la temperatura de hidratación desde 25 °C hasta 45 °C disminuyó el tamaño de partícula desde 135,7 hasta 102,2 nm mientras que mejoraba la recuperación de ARNip desde el 80 % hasta el 87 %. El aumento del porcentaje de etanol final aumentó el tamaño de partícula sin efecto sobre la recuperación de ARNip, pero redujo la eficacia de encapsulación hasta el 88 %.

Tabla 5

Temp. de hidratación [°C]	% de EtOH final	Diam. medio en vol. [nm]			EE [%]	Recuperación de ARNip [%]
		Media	SD	PDI		
25	35	135,7	15,9	0,057	95	80
35	25	103,8	9,8	0,178	94	84
35	35	113,8	15,5	0,156	94	87
35	45	130,8	11,7	0,136	88	86
45	35	102,2	3,4	0,182	93	87

La tabla 6 muestra que el aumento de la razón de fármaco:lípido disminuyó, la recuperación de ARNip aumentó desde el 80 hasta el 87 %. La recuperación máxima se observó a una razón de fármaco:lípido de 0,07 (p:p). Todas las demás propiedades medidas no se vieron afectadas por la razón de fármaco:lípido. Este resultado es sorprendente e inesperado en vista de la divulgación de Maurer *et al.* y Semple *et al.*, quienes describen que la recuperación óptima es a fármaco:lípido (p:p) igual a o mayor de 0,16 (lípido:fármaco (p:p) igual a o menor de 6,25). Los resultados actuales sugieren que se obtiene una tendencia opuesta utilizando el método descrito en el presente documento.

Tabla 6

Lípido:ARNip [peso/peso]	Diam. medio en vol. [nm]			EE [%]	Recuperación de ARNip
	Media	SD	PDI		
9:1	93,9	17,6	0,186	95	80
12:1	85,6	14,0	0,218	95	82
14:1	113,8	15,5	0,156	94	87

La tabla 7 muestra que aumentar el ID de la boquilla 25 veces no afectó al tamaño de partícula, la eficacia de encapsulación o la recuperación de ARNip. Existe una flexibilidad sustancial en el orificio de la boquilla que se usa para añadir el etanol/lípidos a la superficie del tampón. Esta flexibilidad podría proporcionar una importante ventaja durante el aumento a escala.

Tabla 7

ID de boquilla [pulgada]	Diam. medio en vol. [nm]			EE [%]	Recuperación ARNip
	Media	SD	PDI		
0,005	105,2	5,8	0,119	98	81
0,050	100,7	11,7	0,124	96	87
0,125	109,7	13,3	0,097	96	81

Ejemplo 4: comparación del proceso descrito con los métodos referenciados para lotes

(Ejemplo de referencia)

Producción de liposomas

Estos resultados compararon el proceso descrito en el presente documento para preparar partículas de lípido/ácido nucleico con el método descrito por Semple, *et al.* patente estadounidense 6.858.225 (método de control o composición de control usada por el método de control), se prepararon según la composición del ejemplo 3 o usando el método de control.

La composición del ejemplo 3 consistía en un lípido catiónico, DOPE, colesterol, lípido conjugado con PEG y lípido de direccionamiento solubilizados conjuntamente en una razón molar de 40:30:25:5:2 (véase el ejemplo 2, anteriormente).

La composición de control consistía en DODAP, DSPC, colesterol y PEG-CER-14, solubilizados conjuntamente en una razón molar de 25:20:45:10.

En el método del ejemplo 3, se solubilizaron lípidos a 4,32 mg/ml en etanol absoluto, y se solubilizó ARNip a

0,163 mg/ml en citrato 50 mM, pH 4,5. La disolución de ARNip se llevó a 35 °C a 40 °C mientras se agitaba continuamente en un recipiente de mezclado. La mezcla de etanol/lípido se pulverizó entonces sobre la superficie del tampón que contenía ARNip usando una matriz de colectores/boquillas. La concentración final de etanol era del 35 % y la razón final de lípido/ARNip era de 14:1 (p:p). Las partículas resultantes se diluyeron entonces en etanol al 10 % y luego se sometieron a diafiltración frente a volúmenes 10x de PBS (pH 7,2).

En el método de control, se solubilizaron lípidos a 25 mg/ml en etanol absoluto y se solubilizó ARNip a 4,17 mg/ml en citrato 300 mM, pH 4,0. El tampón que contenía ARNip se mantuvo a temperatura ambiente mientras se agitaba continuamente en un recipiente de mezclado. La mezcla de etanol/lípido se pulverizó entonces sobre la superficie del tampón que contenía ARNip usando una única boquilla para formar espontáneamente liposomas cargados con ARNip. La concentración final de etanol era del 40 % y la razón final de lípido/ARNip era de 6:1 (peso:peso). Después de mezclar, la suspensión de lípido/ARNip se transfirió a una extrusora de 10 ml preparada con dos membranas de policarbonato de 100 nm y preequilibrada a 65 °C. La suspensión se extruyó utilizando diez pases a 300 psi. Las partículas resultantes se sometieron a diafiltración frente a volúmenes 10x de PBS, pH 7,2.

Las partículas resultantes de cada método se hicieron pasar a través de un filtro de 0,22 µm. Se midieron el tamaño de partícula medio, PDI y EE tal como se describe en el presente documento.

El método del ejemplo 3 produjo nanopartículas lipídicas más pequeñas que el método de control sin la etapa de extrusión. El tamaño de las partículas producidas por el método de control se midió antes de la extrusión. Las partículas preparadas a partir de la composición de NDT-0009 usando el método de control tenían un tamaño de partícula medio superior a las partículas de 250 nm. Después de la extrusión y diafiltración, el tamaño de partícula promedio se redujo hasta 128 nm. El método del Ejemplo 3 produjo partículas con un tamaño de partícula promedio menor de 150 nm sin extrusión. Se observó una tendencia similar a partir de la composición de control.

El método del ejemplo 3 fue más eficaz en la encapsulación de ARNip en las nanopartículas lipídicas que el método de control. La eficacia de encapsulación (EE) de las partículas preparadas por el método del ejemplo 3 es mayor que la de las partículas formadas por el método de control (medida antes de la diafiltración en ambos productos). La EE de las partículas preparadas por el método del ejemplo 3 son más del 95 % más altas que las encontradas para las partículas formadas por el método de control. En el método de control, gran parte del ARNip libre se elimina después de la diafiltración, lo que da como resultado una mejora en la EE del producto final.

El método del ejemplo 3 produce nanopartículas con una mayor eficacia de encapsulación que el método de control. La recuperación final de ARNip por el método del ejemplo 3 fue más del doble que la obtenida por el método de control (el 72 % frente al 33 %), tal como se midió después de la diafiltración en ambos productos. Estos datos reflejan la mejora en EE, así como la falta de una etapa de extrusión en el método del ejemplo 3. El método del ejemplo 3 proporciona una mejor recuperación de ARNip porque la etapa de extrusión adicional del método de control cambia estructuralmente los liposomas y aparentemente disocia el ARNip de las partículas. Estos resultados muestran que el método descrito en el presente documento proporciona varias ventajas con respecto al método de control al reducir el número de etapas del proceso al tiempo que mejora la eficacia de encapsulación y el rendimiento de nanopartículas con un tamaño de partícula medio inferior a 150 nm.

Ejemplo 5: comparación de la variabilidad durante el aumento a escala de la producción por lotes de liposomas (ejemplo de referencia)

Se realizó el proceso descrito en el ejemplo 3 con una composición lipídica diferente que incluía la combinación de un lípido catiónico cargado permanentemente (HEDC) y una molécula de lípido catiónico ionizable (S104). Se disolvieron HEDC, S104, DOPE, colesterol, un PEG-BML y diVA-PEG750-diVA en etanol absoluto a una razón molar de 20:20:30:25:5:2. Durante el aumento a escala, se evaluaron diferentes moléculas de ARNip, diferentes volúmenes de lote y diferentes razones de ARNip (fármaco)/lípido. La tabla 8 resume los resultados de la caracterización de las nanopartículas resultantes del intervalo de condiciones.

Tabla 8

Vol. de lote [l]	Sustancia farmacológica	fármaco/lípido [p/p]	Tamaño de partícula [nm]	PDI	EE [%]	Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
5	ARNip 1	0,07	93	0,14	97 %	>90 %
20	ARNip 1	0,07	83	0,15	95 %	>90 %
20	Liposomas vacíos (sin ARNip)	n/A	83	0,14	n/A	n/A
20	ARNip 2	0,11	90	0,16	92 %	>90 %
50	ARNip 2	0,07	82	0,14	94 %	>90 %

120	Liposomas vacíos (sin ARNip)	n/A	86	0,14	n/A	n/A
120	ARNip 2	0,11	82	0,14	94 %	>90 %
200	ARNip 1	0,07	86	0,17	94 %	>90 %
200	ARNip 2	0,07	86	0,17	96 %	>90 %

5 Los resultados muestran que el método descrito en el presente documento es bastante robusto. Se obtuvieron tamaños de partícula y PDI similares durante un aumento a escala que abarca un intervalo de 50 veces. El tamaño de partícula es sistemáticamente menor de 100 nm, con > 90 % de rendimiento de producto. Los valores de índice de polidispersidad están en un intervalo muy bajo, lo que indica una población de vesículas casi monodispersa.

Ejemplo 6: comparación de la variabilidad durante el aumento a escala de la producción por lotes de liposomas para formulaciones que contienen sacarosa

10 Se realizó el proceso descrito en el ejemplo 3 se realizó con HEDC, S104, DOPE, colesterol, PEG-BML y diVA-PEG750-diVA disueltos en etanol a una razón molar de 20:20:30:25:25:5:2. Se incluyó sacarosa en la preparación de las vesículas tal como se describe en el presente documento. Se evaluaron diferentes volúmenes de lotes y se sometieron a congelación-descongelación. La tabla 9 resume los resultados de la caracterización de las nanopartículas resultantes de un intervalo de condiciones.

15 Tabla 9

Formulaciones congeladas (que contienen sacarosa) preparadas utilizando un semitrén de fabricación de un solo uso

Vol. de lote [l]	Sustancia farmacológica	fármaco/lípido [p/p]	Antes de congelar			Después de descongelar			Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
			Tamaño [nm]	PDI	EE [%]	Tamaño [nm]	PDI	EE [%]	
5	ARNip 2	0,11	94	0,12	95	96	0,14	93	>90 %
20	ARNip 2	0,11	98	0,15	94	97	0,16	90	>90 %
120	ARNip 2	0,11	96	0,14	90	96	0,14	89	>90 %
120	ARNip 2	0,11	97	0,15	91	99	0,15	89	>90 %
120	ARNip 2	0,11	100	0,15	91	tbd	tbd	tbd	>90 %

20 Los resultados muestran que la congelación-descongelación no cambió las propiedades de las nanopartículas lipídicas. Los resultados también mostraron que la variabilidad entre lotes es bastante baja y que el proceso produce de manera reproducible nanopartículas uniformes.

25 Se han establecido condiciones para la estabilización de partículas de fármaco:lípido por liofilización. Las partículas de fármaco:lípido preparadas según el ejemplo 2 podían liofilizarse sin pérdida de actividad. La concentración final de sacarosa en la que se formaron las partículas de fármaco:lípido fue del 8 % (p/v). Las preparaciones liofilizadas se reconstituyeron añadiendo agua destilada y se midió su actividad de transfección en los pulmones de ratones después de la inyección i.v. La congelación y descongelación de la preparación reconstituida no afectó a la actividad. Los resultados mostrados en la tabla 10 demuestran que las partículas preparadas usando el método descrito en el presente documento conservan sus propiedades durante la liofilización y, por tanto, son estables.

30 Específicamente, el tamaño de partícula se estabiliza y conserva antes, durante y después de la liofilización.

Tabla 10

Formulaciones lio (que contienen sacarosa) preparadas con un semitrén de fabricación de uso único.

Vol. de lote [l]	Sustancia farmacológica	fármaco/lípido [p/p]	Antes de congelar			Después de descongelar			Después de la liofilización + reconstitución		
			Tamaño [nm]	PDI	EE [%]	Tamaño [nm]	PDI	EE [%]	Tamaño [nm]	PDI	EE [%]
20	ARNip 2	0,11	98	0,15	94	97	0,16	90	115	0,15	93

35 La estabilidad de las partículas es una función de la composición lipídica, los valores de lípido:ARN (p:p) y la elección del polisacárido usado en la formulación. El enfoque metódico descrito en el presente documento para producir formulaciones estables de complejos de lípido:ARN que muestran una alta bioactividad *in vivo* confiere ventajas para establecer preparaciones farmacéuticamente aceptables y, por tanto, facilita el suministro de ARN basado en liposomas.

Ejemplo 7: inyección sumergida de lípido (ejemplo de referencia)

Se realizó el proceso tal como se describió en el ejemplo 3 modificado preparando vesículas usando inyección sumergida. Se disolvieron HEDC, S104, DOPE, colesterol, un PEG-BML y diVA-PEG750-diVA en etanol en una razón molar de 20:20:30:25:5:2. La tabla 11 resume los resultados de la caracterización de las nanopartículas resultantes del proceso de adición sumergida en comparación con el proceso de adición en superficie. Los resultados muestran el resultado sorprendente e inesperado de que el tamaño de partícula medio disminuye sustancialmente cuando los lípidos se agregan a la fase acuosa por inyección sumergida.

Tabla 11

Formulaciones líquidas preparadas usando un semitrén de fabricación de un solo uso

Vol. de lote [l]	Sustancia farmacológica	fármaco/lípido [p/p]	Método de adición	Partícula tamaño		EE [%]	Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
				Media [nm]	PDI		
5	ARNip 1	0,07	Superficie	93	0,136	97	>90 %
5	ARNip 1	0,07	Sumergido	57	0,104	97	>90 %

Formulaciones congeladas (que contienen sacarosa) preparadas usando un semitrén de fabricación de un solo uso

Vol. de lote [l]	Sustancia farmacológica	fármaco/lípido [p/p]	Método de adición	Tamaño de partícula		EE [%]	Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
				Media [nm]	PDI		
5	ARNip 1	0,11	Superficie	94	0,119	95	>90 %
1	ARNip 1	0,11	Sumergido	63	0,102	95	>90 %

Se usó el mismo procedimiento para preparar liposomas que contienen sacarosa en el tampón. La tabla 12 resume los resultados de la caracterización de las nanopartículas resultantes de los diferentes tiempos de adición y la tabla 13 resume los resultados de la caracterización de las nanopartículas preparadas usando la adición en superficie en comparación con sumergida.

Tabla 12

Formulaciones líquidas preparadas usando un semitrén de fabricación de un solo uso

Tiempo de adición [min]	Método de adición	Tamaño de partícula		EE [%]	Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
		Media [nm]	PDI		
0,5*	Sumergida	66	0,140	90	>90 %
2,0	Sumergida	93	0,112	94	>90 %
5,0	Sumergida	99	0,133	92	>90 %
10	Sumergida	98	0,137	91	>90 %

* No conforme a la invención.

Tabla 13

Formulaciones líquidas preparadas usando un semitrén de fabricación de un solo uso

Vol. de lote [l]	Tiempo de adición [min]	Método de adición	Tamaño de partícula		EE [%]	Rendimiento del producto [recuperación de ARNip]
			Media [nm]	PDI		
5	15	Superficie	93	0,136	95	>90 %
1	1,5	Sumergida	63	0,102	95	>90 %

Los resultados muestran el resultado sorprendente e inesperado de que el tamaño de partícula medio disminuye sustancialmente cuando los lípidos se añaden a la fase acuosa mediante inyección sumergida con un tiempo de adición de menos de 2 minutos. Los resultados también muestran los resultados sorprendentes de que el tamaño de partícula medio disminuye sustancialmente cuando los lípidos se añaden a la fase acuosa por inyección sumergida.

REIVINDICACIONES

1. Método para preparar de manera estéril una nanopartícula de lípido-ácido nucleico en condiciones asépticas, que comprende el uso de un sistema que comprende componentes de un solo uso, que comprende:

una 1.^a unidad de contención para una disolución lipídica orgánica que comprende lípidos en un disolvente orgánico miscible con agua;

una 2.^a unidad de contención para una disolución acuosa que comprende un fármaco terapéutico;

una unidad de mezclado con una mezcladora estática;

un medio de inyección para añadir la disolución lipídica orgánica desde la 1.^a unidad de contención hasta la cámara de mezclado de un modo para formar un gradiente de la concentración de disolvente orgánico de la disolución en la unidad de mezclado de manera que el aumento es gradual desde un valor de inyección inicial hasta un valor de inyección final;

una 3.^a unidad de contención para un tampón acuoso;

una unidad de dilución;

una unidad de concentración que comprende un filtro de transflujo para concentrar la suspensión de liposomas y eliminar el disolvente orgánico; y

un lecho de un solo uso para recoger la suspensión de liposomas concentrada tras la eliminación del disolvente orgánico;

y en el que todos los componentes del sistema, que están en contacto con lípidos, fármacos, disolventes y tampones se esterilizan y pueden desecharse de modo que están adaptados para su uso en un único lote;

en el que el método se lleva a cabo de manera que

el disolvente orgánico miscible con agua es etanol;

la unidad de mezclado contiene la disolución acuosa de fármaco, y la disolución lipídica se añade constantemente a la disolución de fármaco en la unidad de mezclado formando de ese modo dicho gradiente de manera que el suministro de la disolución orgánica se completa en de 1 minuto a 100 minutos, de manera que se alcanza una razón de ARN:lípido de 0,06 a 0,16 (p:p) y de manera que se alcanza una concentración de etanol final del 25-45 %; y

en el que la mezcla de lípido-fármaco se transfiere a la unidad de dilución y se diluye mediante la adición del tampón acuoso.

2. Método según la reivindicación 1, en el que los lípidos comprenden un lípido catiónico, un lípido neutro, un esteroil y un conjugado de polietileno (PEG)-lípido, en el que los lípidos comprenden además opcionalmente un lípido de direccionamiento seleccionado del grupo que consiste en ácido fólico, vitamina E, compuestos de la siguiente fórmula (A) y compuestos de la siguiente fórmula (B):



en la que el lípido (L) se selecciona del grupo que consiste en DSPE, DOPE y DC; el ligador (X) se selecciona del grupo que consiste en nada, PEG550, PEG2000, PEG-glutamato (-Glu), Glu, glicina y GluNH, y N1,N19-bis(3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida; y el retinoide (R) se selecciona del grupo que consiste en tretinoína, adapaleno, retinol, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR), ácido retinoico (vitamina A), ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,2,6-trimetilciclohexil)nonanoico;



en la que el ligador (X) es N1,N19-bis(3-(2-(2-(3-aminopropoxi)etoxi)etoxi)propil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida ("bisamido-PEG") o N1,N19-bis(16,20-diamino-15-oxo-4,7,10-trioxa-14-azaicosil)-4,7,10,13,16-pentaoxonadecano-1,19-diamida ("lys-bisamido-PEG-lys"); y el retinoide (R) se selecciona del grupo que consiste en tretinoína, adapaleno, retinol, 4-hidroxi(fenil)retinamida (4-HPR) y ácido retinoico (vitamina A), ácido 9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,6,6-trimetilciclohex-1-en-1-il)nonanoico, ácido 3,7-dimetil-9-(2,2,6-trimetilciclohexil)nonanoico.

3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que el fármaco terapéutico es una molécula de ARNbc.

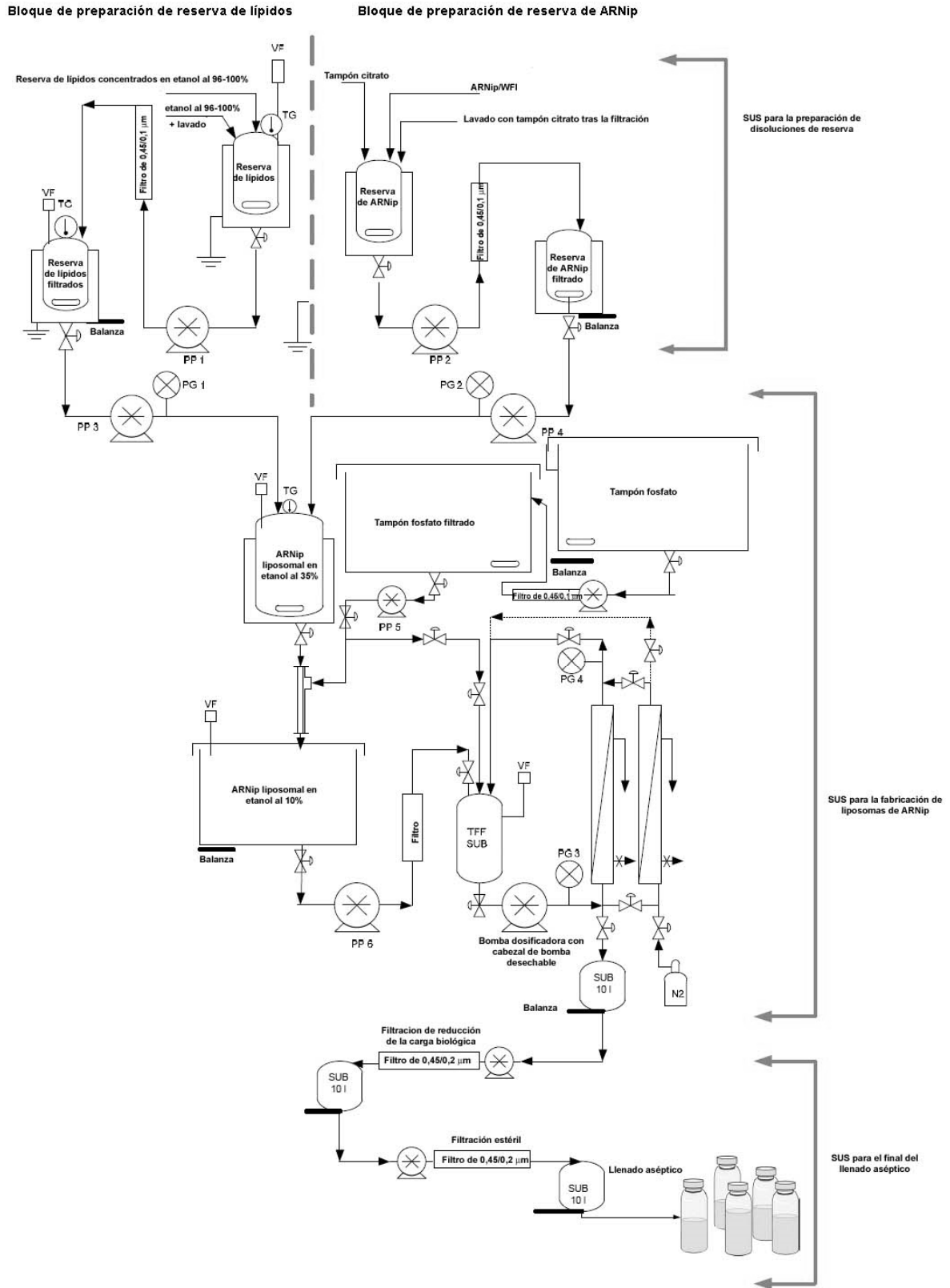


FIG. 1