

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 373**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11	(2006.01)	C07C 237/06	(2006.01)
A61K 9/127	(2006.01)	C07D 295/03	(2006.01)
A61K 38/54	(2006.01)	C07D 211/36	(2006.01)
C07D 233/61	(2006.01)	C07D 295/13	(2006.01)
C07C 211/09	(2006.01)	C07D 295/15	(2006.01)
C07C 211/11	(2006.01)	C07D 233/64	(2006.01)
C07C 211/13	(2006.01)		
C07C 211/14	(2006.01)		
C07D 239/42	(2006.01)		
C07D 241/04	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.10.2012 PCT/US2012/060875**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13059496**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2012 E 12841768 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 2768958**

54 Título: **Lípidos catiónicos de amina y uso de los mismos**

30 Prioridad:

18.10.2011 US 201161548598 P

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

02.03.2020

73 Titular/es:

**DICERNA PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
87 Cambridgepark Dr.
Cambridge, MA 02140, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, BOB, DALE;
BASU, SUJIT, KUMAR;
SCHWARTZ, DAVID y
FRASER, ALLISTER**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 745 373 T3

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

DESCRIPCIÓN

Lípidos catiónicos de amina y uso de los mismos

Antecedentes de la invención

5 La invención se refiere, en parte, a compuestos de lípidos catiónicos de aminas, así como a formulaciones de los mismos, y su uso en el suministro de agentes terapéuticos, tales como moléculas de ácido nucleico, a las células.

10 Las moléculas de ácido nucleico no pueden atravesar fácilmente las membranas celulares debido a su tamaño e hidrofiliidad. Por lo tanto, el suministro ha sido uno de los principales desafíos para la terapéutica de ácidos nucleicos, por ejemplo, cargas útiles antisentido y tecnología de iARN. Para desencadenar la actividad de RNasa H o la actividad de iARN después de la administración sistémica, una formulación que contiene moléculas de ácido nucleico no solo debe (1) proteger la carga útil de la degradación enzimática y no enzimática y (2) proporcionar una biodistribución adecuada de la formulación, sino también (3) permitir la absorción celular o la internalización de la formulación y (4) facilitar el suministro de la carga útil de ácidos nucleicos al citoplasma de la célula. Muchas formulaciones que sobresalen en los criterios 1 y 2 anteriores son deficientes en los criterios 3 y 4 y, por lo tanto, muchas formulaciones de ácido nucleico muestran una excelente biodistribución pero no logran anular el gen diana debido a la carencia de suministro sistémico y suministro local.

Guedj, C. et al, Chemistry and Physics of Lípidos, 72 (2): 153-173 (1994), divulgan una serie de glicolípidos de hidrocarburos y/o fluorocarbonos de doble cola derivados de galactosa y glucosa.

20 El documento WO 94/03468 divulga derivados anfífilos de aminoácidos o péptidos, que comprenden una parte hidrófila polihidroxilada derivada de un azúcar, de un poliol, de un aminopolioleol o de un oligosacárido, y al menos una parte hidrófoba derivada de un hidrocarburo, fluorocarbono o un fluorocarbono/hidrocarburo mixto, saturado o insaturado, que tiene de 5 a 20 átomos de carbono, estando enlazadas las partes hidrófobas a la parte hidrófila por una unión que lleva un aminoácido o un péptido.

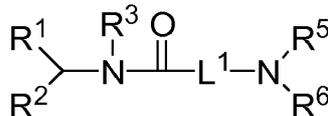
El documento US 7 303 881 B2 divulga composiciones/adyuvantes de suministro de antígeno y métodos para usarlos para prevenir o tratar cánceres y otras enfermedades infecciosas.

25 En consecuencia, existe la necesidad de nuevos compuestos para el suministro de agentes terapéuticos, tal como los agentes de iARN. En particular, los compuestos capaces de actuar como lípidos catiónicos pueden usarse en formulaciones de partículas lipídicas para suministrar cargas útiles de ácidos nucleicos a las células.

Resumen de la invención

30 Los inventores han desarrollado novedosos compuestos lipídicos a base de amina, incluidos los lípidos catiónicos de amino-amina y amino-amida, así como sus formulaciones, para el suministro de uno o más agentes terapéuticos. En particular, los compuestos de la invención se pueden usar para suministrar una carga útil polianiónica o una carga útil antisentido (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico o agentes de iARN) a las células y silenciar un gen diana.

En un aspecto, la invención presenta un compuesto que tiene la fórmula:



35 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, donde cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄, alquenilo C₁₁₋₂₄ o alquinilo C₁₁₋₂₄; R³ es H; L¹ es alquilenilo C₁; y cada R⁵ y R⁶ es alquilo C₁₋₆.

En algunas realizaciones, el compuesto se selecciona del grupo que consiste en L-30 y L-49, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40 En algunas realizaciones, cada R¹ y R² es, independientemente, alquenilo C₁₁₋₂₄ que incluye formas lineales y ramificadas (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, alquenilo C₁₁₋₂₄ que contiene uno o más dobles enlaces). En algunas realizaciones, uno de R¹ o R² no es alquilo C₁₁₋₂₄ saturado. En algunas realizaciones, tanto R¹ como R² no son alquilo C₁₁₋₂₄ saturado. En algunas realizaciones, cada R¹ y R² se selecciona, independientemente, del grupo que consiste en linolenilo (C18: 3), linoleilo (C18: 2), oleilo (C18: 1), estearilo (C18: 0), palmitilo (C16: 0), miristilo (C14: 0), laurilo (C12: 0), por ejemplo, linoleilo (C18:2) u oleilo (C18: 1). En algunas realizaciones, R¹ y R² son iguales o diferentes.

En otro aspecto, el compuesto de la invención incluye R¹R²-CH-A, donde R¹ y R² es un grupo de cola (por ejemplo, cualquiera de los descritos aquí, por ejemplo, en la Tabla 4) y A es un grupo de cabeza (H-43).

En otro aspecto, el compuesto de la invención es cualquier compuesto proporcionado en la Tabla 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto, la invención presenta una formulación que incluye cualquier compuesto descrito aquí (por ejemplo, uno o más compuestos proporcionados en la Tabla 1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas realizaciones, la formulación incluye dos o más de los compuestos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más de los compuestos.

- 5 En algunas realizaciones, la formulación incluye entre aproximadamente 10% y aproximadamente 80% del compuesto, por ejemplo, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 15%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 10% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 20%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 15% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 20% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 25% y aproximadamente 30%, entre aproximadamente 25% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 25% y aproximadamente 40%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 35%, entre aproximadamente 30% y aproximadamente 40%, o entre aproximadamente 35% y aproximadamente 40%, de uno o más compuestos de la invención.

En algunas realizaciones, la formulación incluye además un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, DPePC, DODAP o DOTAP), un lípido neutro (por ejemplo, DSPC, POPC, DOPE o SM), y, opcionalmente, un derivado de esteroides (por ejemplo, colesterol; colestano; colesteno; coprostanol; 3β -[-(N-(N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoyl]colesterol (DC-colesterol); bis-guanidinium-tren-colesterol (BGTC); (2S, 3S)-2-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9, 10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta [a]fenantren-3-iloxi)carbonilamino)etil 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato (DPC-1); (2S,3S)-((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato (DPC-2); bis ((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il)2,3,4-trihidroxipentanodioato (DPC-3); o 6-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)oxidofosforiloxi)-2,3,4,5-tetrahidroxihexanoato (DPC-4)). En algunas realizaciones, la formulación incluye además un conjugado de PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DMG, PEG-DMPE, PEG-DPPE, PEG-DPG, PEG-DOPE o PEG-DOG).

- 30 En algunas realizaciones, la formulación incluye de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, uno o más de los compuestos descritos aquí, por ejemplo, en la Tabla 1), de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más lípidos catiónicos o uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, uno o más de cualquiera de los compuestos descritos aquí, por ejemplo, en la Tabla 1), de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más más conjugados de PEG-lípidos, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más lípidos neutros, y de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más derivados de esteroides.

En realizaciones particulares, la formulación incluye de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 80% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 40% en moles a aproximadamente 55% en moles, tal como aproximadamente 48% en moles) de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, compuestos de invención y/u otros lípidos catiónicos, como se describe aquí), de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más lípidos neutros, y de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más derivados de esteroides. En algunas realizaciones, la formulación incluye de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 30% en moles (por ejemplo, aproximadamente 22% en moles) de uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, L-6, L-30, y/o cualquiera de los descritos aquí), de aproximadamente 15% en moles a aproximadamente 35% en moles (por ejemplo, aproximadamente 26% en moles) de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA o cualquiera de los descritos aquí), de aproximadamente 3% en moles a aproximadamente 9% en moles (por ejemplo, aproximadamente 6% en moles) de uno o más conjugados de PEG-lípidos (por ejemplo, PEG-DSPE, PEG-DMPE, y/o cualquiera de los descritos aquí), de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 20% en moles (por ejemplo, aproximadamente 14% en moles) de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC o cualquiera de los descritos aquí), y de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 29% en moles a aproximadamente 33% en moles, tal como aproximadamente 33% en moles) de uno o más derivados de esteroides (por ejemplo, colesterol, un derivado del mismo, o cualquiera de los descritos aquí).

En algunas realizaciones, uno o más compuestos de la invención están presentes en una cantidad entre aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles, por ejemplo, entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 15% en moles, entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 20% en moles, entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 25% en moles, entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 30% en moles, entre aproximadamente 10% en moles y aproximadamente 35% en moles, entre aproximadamente 15% en moles y aproximadamente 20% en moles, entre aproximadamente 15% en moles y

aproximadamente 65 % en moles, entre aproximadamente 45 % en moles y aproximadamente 70 % en moles, entre aproximadamente 45 % en moles y aproximadamente 75 % en moles, o entre aproximadamente 45 % en moles y aproximadamente 80 % en moles, entre aproximadamente 50 % en moles y aproximadamente 55 % en moles, entre aproximadamente 50 % en moles y aproximadamente 60 % en moles, entre aproximadamente 50 % en moles y aproximadamente 65 % en moles, entre aproximadamente 50 % en moles y aproximadamente 70 % en moles, entre aproximadamente 50 % en moles y aproximadamente 75 % en moles, o entre aproximadamente 50 % en moles y aproximadamente 80 mol % (por ejemplo, aproximadamente 21.0 % en moles, 21.2 % en moles, 21.4 % en moles, 21.6 % en moles, 21.8 % en moles, 22 % en moles, 25 % en moles, 26 % en moles, 26 % en moles, 30 % en moles, 35 % en moles, 40 % en moles, 45 % en moles, 48 % en moles, 49 % en moles, 50 % en moles, 55 % en moles, 60 % en moles, 65 % en moles, 70 % en moles, o 75 % en moles) de uno o más compuestos de la invención.

En algunas realizaciones, uno o más lípidos catiónicos están presentes en una cantidad entre aproximadamente 10 % en moles a aproximadamente 40 % en moles, por ejemplo, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 25 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 30 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 25 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 30 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 40 % en moles, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 25 % en moles, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 30 % en moles, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 40 % en moles, entre aproximadamente 25 % en moles y aproximadamente 30 % en moles, entre aproximadamente 25 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 25 % en moles y aproximadamente 40 % en moles, entre aproximadamente 30 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 30 % en moles y aproximadamente 40 % en moles, o entre aproximadamente 35 % en moles y aproximadamente 40 mol % (por ejemplo, aproximadamente 25.1 % en moles, 25.2 % en moles, 25.3 % en moles, 25.4 % en moles, 25.5 % en moles, 25.6 % en moles, 25.7 % en moles, 25.8 % en moles, 25.9 % en moles, 26.0 % en moles, 26.2 % en moles, 26.4 % en moles, 26.6 % en moles, 26.8 % en moles, o 27 % en moles) de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA o cualquiera de los descritos aquí, tal como en la Tabla 1).

En algunas realizaciones, uno o más conjugados de PEG-lípidos están presentes en una cantidad entre aproximadamente 1 % en moles a aproximadamente 20 % en moles, por ejemplo, entre aproximadamente 1 % en moles y aproximadamente 5 % en moles, entre aproximadamente 1 % en moles y aproximadamente 10 % en moles, entre aproximadamente 1 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 2 % en moles y aproximadamente 5 % en moles, entre aproximadamente 2 % en moles y aproximadamente 10 % en moles, entre aproximadamente 2 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 2 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 10 % en moles, entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 20 % en moles (por ejemplo, aproximadamente 2.5 % en moles, 2.6 % en moles, 2.7 % en moles, 2.8 % en moles, 2.9 % en moles, 3 % en moles, 3.5 % en moles, 4 % en moles, 4.3 % en moles, 4.5 % en moles, 4.7 % en moles, 5 % en moles, 5.3 % en moles, 5.5 % en moles, 5.7 % en moles, 6 % en moles, 6.5 % en moles, 6.7 % en moles, 7 % en moles, 7.5 % en moles, 8 % en moles, 8.5 % en moles, o 9 % en moles) de uno o más conjugados de PEG-lípidos (por ejemplo, PEG-DSPE, PEG-DMPE, y/ o cualquiera de los descritos aquí).

En algunas realizaciones, uno o más lípidos neutros están presentes en una cantidad entre aproximadamente 5 % en moles a aproximadamente 20 % en moles, por ejemplo, entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 10 % en moles, entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 5 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 7 % en moles y aproximadamente 10 % en moles, entre aproximadamente 7 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 7 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 15 % en moles, entre aproximadamente 10 % en moles y aproximadamente 20 % en moles, entre aproximadamente 15 % en moles y aproximadamente 20 mol % (por ejemplo, aproximadamente 13.0 % en moles, 13.2 % en moles, 13.4 % en moles, 13.6 % en moles, 13.8 % en moles, 14 % en moles, 14.1 % en moles, 14.3 % en moles, 14.5 % en moles, 14.7 % en moles, o 14.9 % en moles) de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC o cualquiera de los descritos aquí).

En algunas realizaciones, uno o más derivados de esteroides están presentes en una cantidad entre aproximadamente 20 % en moles a aproximadamente 40 % en moles, por ejemplo, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 25 % en moles, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 30 % en moles, entre aproximadamente 20 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 25 % en moles y aproximadamente 30 % en moles, entre aproximadamente 25 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 25 % en moles y aproximadamente 40 % en moles, entre aproximadamente 30 % en moles y aproximadamente 35 % en moles, entre aproximadamente 30 % en moles y aproximadamente 40 % en moles, o entre aproximadamente 35 % en moles y aproximadamente 40 mol % (por ejemplo, aproximadamente 28.4 % en moles, 28.6 % en moles, 28.8 % en moles, 29.0 % en moles, 30 % en moles, 31 % en moles, 32 % en moles, 33 % en moles,

33.2 % en moles, 33.4 % en moles, 33.6 % en moles, 33.8 % en moles, 34 % en moles, 34.4 % en moles, 34.7 % en moles, o 34.9 % en moles) de uno o más derivados de esteroides (por ejemplo, colesterol o cualquiera de los descritos aquí).

5 En algunas realizaciones, la formulación incluye una o más partículas lipídicas que comprenden uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección, donde el uno o más agentes de unión a ARN incluyen de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más lípidos catiónicos o uno o más compuestos de la invención y de aproximadamente 0.5% en moles a aproximadamente 10% en moles de uno o más lípidos de PEG; y donde el uno o más lípidos de transfección incluyen de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más compuestos de la invención, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más lípidos neutros, de aproximadamente 0.5% en moles a aproximadamente 10% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos, y de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más derivados de esteroides. Formulación adicional y porcentajes son como se describen en el presente documento.

15 En algunas realizaciones, la formulación incluye además una carga útil polianiónica o una carga útil antisentido. En algunas realizaciones, la carga útil polianiónica es un agente de iARN (por ejemplo, ARNbc, ARNip, miRNA, ARNhc, ARNsgpt o ARNsiD, por ejemplo, ARNsiD). En algunas realizaciones, el agente de iARN tiene una longitud de 10 a 40 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 10 a 15 nucleótidos, 10 a 20 nucleótidos, 10 a 25 nucleótidos, 10 a 30 nucleótidos, 10 a 35 nucleótidos, 15 a 20 nucleótidos, 15 a 25 nucleótidos, 15 a 30 nucleótidos, 15 a 35 nucleótidos, 15 a 40 nucleótidos, 16 a 20 nucleótidos, 16 a 25 nucleótidos, 16 a 30 nucleótidos, 16 a 35 nucleótidos, 16 a 40 nucleótidos, 20 a 25 nucleótidos, 18 a 20 nucleótidos, 18 a 25 nucleótidos, 18 a 30 nucleótidos, 18 a 35 nucleótidos, 18 a 40 nucleótidos, 19 a 20 nucleótidos, 19 a 25 nucleótidos, 19 a 30 nucleótidos, 19 a 35 nucleótidos, 19 a 40 nucleótidos, 20 a 30 nucleótidos, 20 a 35 nucleótidos, 20 a 40 nucleótidos, 25 a 30 nucleótidos, 25 a 35 nucleótidos, 25 a 40 nucleótidos, 30 a 35 nucleótidos, 30 a 40 nucleótidos o 35 a 40 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 25 a 35 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 16 a 30 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 19 a 29 nucleótidos.

25 En algunas realizaciones, la carga útil antisentido tiene una longitud de 8 a 50 nucleótidos (por ejemplo, una longitud de 8 a 10 nucleótidos, 8 a 15 nucleótidos, 8 a 15 nucleótidos, 8 a 20 nucleótidos, 8 a 25 nucleótidos, 8 a 30 nucleótidos, 8 a 35 nucleótidos, 8 a 40 nucleótidos u 8 a 45 nucleótidos), por ejemplo, una longitud de 14 a 35 nucleótidos (por ejemplo, una longitud de 14 a 15 nucleótidos, 14 a 20 nucleótidos, 14 a 25 nucleótidos, o 14 a 30 nucleótidos), por ejemplo, una longitud de 17 a 24 nucleótidos, por ejemplo, una longitud de 17 a 20 nucleótidos.

30 En algunas realizaciones, la formulación incluye una relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p) de la carga útil polianiónica con respecto al lípido total presente en la formulación, por ejemplo, relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:15 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:20 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:40 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:50 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), relación de aproximadamente 1:10 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:40 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:50 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), relación de aproximadamente 1:20 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:50 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), relación de aproximadamente 1:40 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:60 (p/p), relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), relación de aproximadamente 1:50 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:70 (p/p), relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:80 (p/p), relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/w), relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), relación de aproximadamente 1:60 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p), relación de aproximadamente 1:80 (p/p) a aproximadamente 1:90 (p/p), relación de aproximadamente 1:80 (p/p) a aproximadamente 1:95 (p/p), o relación de aproximadamente 1:80 (p/p) a aproximadamente 1:100 (p/p) de la carga útil polianiónica con respecto al lípido total presente en la formulación.

En algunas realizaciones, la formulación incluye un liposoma (por ejemplo, una nanopartícula lipídica), un lipoplex o una micela.

60 En un aspecto, la invención presenta una composición farmacéutica que incluye cualquier compuesto descrito aquí (por ejemplo, uno o más compuestos proporcionados en la Tabla 1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, o cualquier formulación descrita aquí; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención presenta compuestos proporcionados en la Tabla 1 para su uso en un método de tratamiento o tratamiento profiláctico de una enfermedad en un sujeto, incluyendo el método administrar al sujeto cualquier compuesto descrito en el presente documento (por ejemplo, uno o más compuestos proporcionados en la Tabla 1), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cualquier formulación descrita aquí, o cualquier composición descrita en una cantidad suficiente para tratar la enfermedad (por ejemplo, cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, colangiocarcinoma, angiosarcoma o hemangiosarcoma), cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), cáncer de próstata o neuroblastoma). La invención presenta además compuestos proporcionados en la Tabla 1 para su uso en un método de tratamiento o tratamiento profiláctico de enfermedades neoplásicas y complicaciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, carcinomas (por ejemplo, pulmón, mama, páncreas, colon, hepatocelular, renal, tracto genital femenino, próstata, células escamosas, carcinoma in situ), linfoma (por ejemplo, linfoma histiocítico, linfoma no Hodgkin), síndromes MEN2, neurofibromatosis (incluida la neoplasia de células de Schwann), síndrome mielodisplásico, leucemia, angiogénesis tumoral, cánceres de tiroides, hígado, hueso, piel, cerebro, sistema nervioso central, páncreas, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas), mama, colon, vejiga, próstata, tracto gastrointestinal, endometrio, trompas de Falopio, testículos y ovario, tumores estromales gastrointestinal (GIST), tumores de próstata, tumores de mastocitos (incluidos los tumores de mastocitos caninos), mielofibrosis mieloide aguda, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, melanoma, mastocitosis, gliomas, glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, sarcomas (por ejemplo, sarcomas de origen neuroectodérmico o leiomiomasarcoma), metástasis de tumores a otros tejidos e hipoxia inducida por quimioterapia.

En otro aspecto, la invención presenta compuestos proporcionados en la Tabla 1 para su uso en un método de modulación de la expresión de un ácido nucleico diana en un sujeto, incluyendo el método la administración de cualquier compuesto descrito aquí (por ejemplo, uno o más compuestos proporcionados en la Tabla 1) , o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, cualquier formulación descrita aquí, o cualquier composición descrita en una cantidad suficiente para reducir la expresión del gen diana (por ejemplo, cualquiera de los descritos aquí, por ejemplo, uno o más genes diana seleccionados del grupo que consiste en ABL1 , AR, β -Catenina (CTNNB1), BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA1, ERBA2, ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MET, MDM2, MLL1, MLL2, MLL3, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TAL2, TCL3, TCL5, YES, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, WT1, ApoB100, CSN5, CDK6, ITGB1, TGF β 1, Ciclina D1, hepcidina, PCSK9, TTR, PLK1 y proteína de unión a KIF1) en el sujeto (por ejemplo, donde el método incluye reducir la expresión del gen diana en el sujeto).

En otra realización, la invención presenta la administración de una dosificación de la carga útil polianiónica o carga útil antisentido de la invención a un sujeto una o más veces al día (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 veces al día), una o más veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces por semana) o una o más veces por mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 10 veces por mes) . Un sujeto puede recibir dosificaciones de la carga útil polianiónica o carga útil antisentido en el rango de aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 10 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0.0001 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mg/kg, o aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, en cualquier régimen de dosificación (por ejemplo, una o más veces por día (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 veces por día), una o más veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces por semana) o una o más veces por mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 10 veces por mes))

En algunas realizaciones, la invención presenta la administración de una formulación de la invención a un sujeto una o más veces por día (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 veces por día), una o más veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces por semana) o una o más veces por mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 10 veces por mes). Un sujeto puede recibir dosificaciones de la formulación en el rango de aproximadamente 0.001 a aproximadamente 200 mg/kg, por ejemplo, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0.001 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 0.01 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 0.1 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 1 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 20 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mg/kg, aproximadamente 10 a aproximadamente 200 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/kg, o aproximadamente 20 a aproximadamente 200 mg/kg, en cualquier régimen de dosificación (por ejemplo, una o más

veces por día (por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 veces por día), una o más veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces por semana) o una o más veces por mes (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7 o 10 veces por mes)).

5 En otro aspecto, la invención presenta un método para suministrar una carga útil polianiónica o carga útil antisentido a un tipo específico de tejido. Ejemplos de tipos específicos de tejidos a los que se puede administrar la carga útil incluyen, pero no se limitan a, hígado, páncreas, pulmón, próstata, riñón, médula ósea, bazo, timo, nodo linfático, cerebro, médula espinal, corazón, músculo esquelético, piel, mucosa oral, esófago, estómago, íleon, intestino delgado, colon, vejiga, cuello uterino, ovario, testículo, glándula mamaria, glándula adrenal, tejido adiposo (blanco y/o marrón), sangre (por ejemplo, células hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34+, células CD4+), linfocitos y otras células de linaje sanguíneo.

10 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen dos grupos de cola de lípidos insaturados (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₁₋₂₄ o alqueno C₁₁₋₂₄).

En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen grupos de cola de lípidos, donde estos grupos no incluyen uno o más grupos biodegradables (por ejemplo, uno o más grupos éster).

15 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención incluyen dos grupos de cola de lípidos que tienen más de 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 18 carbonos (por ejemplo, cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₇₋₂₄ o alqueno C₁₅₋₂₄; cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₆₋₂₄ o alqueno C₁₆₋₂₄; cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₇₋₂₄ o alqueno C₁₇₋₂₄; o cada R¹ y R² es, independientemente, alqueno C₁₈₋₂₄ o alqueno C₁₈₋₂₄).

20 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención excluyen N-(4-N',N'-dimetilamino)butanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-amina o N-(3-N',N'-dimetilamino)propanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-amina, o sales de los mismos. En algunas realizaciones, los compuestos de la invención excluyen N-metil-N-(4-N',N'-dimetilamino)butanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-amina o N-metil-N-(3-N',N'-dimetilamino)propanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z)-heptatriaconta-6,9,28,31-tetraen-19-amina, o sales de los mismos.

25 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención excluyen N-(4-N',N'-dimetilamino)butanoil-(6Z,9Z,28Z)-heptatriaconta-6,9,28-trien-19-amina, N-metil-N-(4-N',N'-dimetilamino)butanoil-(6Z,9Z,28Z)-heptatriaconta-6,9,28-trien-19-amina, N-(4-N',N'-dimetilamino)butanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-heptatriaconta-6,9,28,31,34-pentaen-19-amina, N-metil-N-(4-N',N'-dimetilamino)butanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-heptatriaconta-6,9,28,31,34-pentaen-19-amina, N-(3-N',N'-dimetilamino)propanoil-(9-amina,N-metil-N-(3-N',N'-

30 dimetilamino)propanoil-(6Z,9Z,28Z)-heptatriaconta-6,9,28-trien-19-amina, N-(3-N',N'-dimetilamino)propanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-heptatriaconta-6,9,28,31,34-pentaen-19-amina, N-metil-N-(3-N',N'-dimetilamino)propanoil-(6Z,9Z,28Z,31Z,34Z)-heptatriaconta-6,9,28,31,34-pentaen-19-amina, o sales de los mismos.

35 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención excluyen di((Z)-non-2-en-1-il) 9-(((3-(dimetilamino)propanoil)amino)heptadecanodioato, di((Z)-non-2-en-1-il) 9-(((4-(dimetilamino)butanoil)amino)heptadecanodioato, di((Z)-non-2-en-1-il) 9-(((5-(dimetilamino)pentanoil)amino)heptadecanodioato, o sus sales.

40 En cualquiera de los aspectos anteriores, los compuestos de la invención tienen un valor de pKa menor de 6.2 y mayor de 6.5 (por ejemplo, un valor de pKa entre 4.0 y 6.2, tal como entre 4.0 y 5.2, entre 4.0 y 5.6, o entre 4.0 y 5.8; o entre 6.5 y 8.5, por ejemplo, entre 6.5 y 7.0, entre 6.5 y 7.5, o entre 6.5 y 8.0). En realizaciones particulares, el valor de pKa está entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 6.0 (por ejemplo, entre 5.0 y 5.5, entre 5.0 y 5.6, entre 5.0 y 5.7, entre 5.0 y 5.8, entre 5.0 y 5.9, entre 5.0 y 6.0, entre 5.2 y 5.5, entre 5.2 y 5.6, entre 5.2 y 5.7, entre 5.2 y 5.8, entre 5.2 y 5.9, entre 5.2 y 6.0, entre 5.4 y 5.5, entre 5.4 y 5.6, entre 5.4 y 5.7, entre 5.4 y 5.8, entre 5.4 y 5.9, entre 5.4 y 6.0, entre 5.6 y 5.7, entre 5.6 y 5.8, entre 5.6 y 5.9, o entre 5.6 y 6.0). El valor de pKa puede determinarse mediante cualquier método útil, por ejemplo, midiendo la fluorescencia del ácido 2-(p-toluidino)-6-naftalensulfónico (TNS), mediciones de potencial zeta, etc. En realizaciones particulares, el valor de pKa es la relación de la concentración de lípido catiónico cargado y la concentración de lípido no cargado (por ejemplo, medido por titulación de fluorescencia TNS in situ, donde pKa se define como el pH a la intensidad de fluorescencia semi-máxima).

Definiciones

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa ± 10% del valor citado.

50 Por "alqueno" se entiende un grupo monovalente de cadena lineal o ramificada de, a menos que se especifique de otra manera, de 2 a 24 átomos de carbono que contienen uno o más dobles enlaces carbono-carbono. Los grupos alqueno se ejemplifican por etenilo, 1-propenilo, 2-propenilo, 2-metil-1-propenilo, 1-butenilo, 2-butenilo, oleilo, linoleilo, linolenilo y similares. El término "alqueno C_{x-y}" representa grupos alqueno que tienen entre x y y carbonos. Los valores de ejemplo para x son 2, 3, 4, 5 y 11; para y son 3, 4, 5, 6 y 24; y para x a y son 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 14 a 24, 16 a 24, 18 a 24, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 14 a 22, 16 a 22, 18 a 22, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20, o 18 a 20. En algunas realizaciones, el alqueno puede estar adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define aquí para un grupo alqueno.

Por "alquilo" se entiende un grupo saturado monovalente lineal o ramificado de, a menos que se especifique de otra manera, de 1 a 24 átomos de carbono. Los grupos alquilo se ejemplifican por metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, n-butilo, sec-butilo, iso-butilo, tert-butilo, neopentilo, laurilo, miristilo, palmitilo, estearilo y similares, y pueden ser opcionalmente sustituidos con uno, dos, tres o, en el caso de grupos alquilo de dos carbonos o más, cuatro sustituyentes seleccionados independientemente del grupo que consiste en: (1) alcoxi; (2) amino, como se define en el presente documento; (3) halo, tal como F, Cl, Br o I; (4) (heterocicli)oxi; (5) heterocicli; (6) alquilo; (7) alquenilo; (9) alquinilo; (10) cicloalquilo; (11) hidroxilo; (12) nitro; o (13) oxo (por ejemplo, carboxialdehído o acilo). En algunas realizaciones, cada uno de estos grupos puede sustituirse adicionalmente como se describe en el presente documento. El término "alquilo C_{x-y}" representa grupos alquilo que tienen entre x y y carbonos. Los valores de ejemplo para x son 1, 2, 3, 4, 5 y 11; para y son 2, 3, 4, 5, 6 y 24; y para x a y son 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 14 a 24, 16 a 24, 18 a 24, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 14 a 22, 16 a 22, 18 a 22, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20 o 18 a 20.

El término "alquilenilo" y el prefijo "alq", como se usa en el presente documento, representan un grupo hidrocarburo polivalente (por ejemplo, divalente) derivado de un hidrocarburo de cadena lineal o ramificada mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno. Los grupos alquilenilo se ejemplifican por metileno, etileno, isopropileno y similares. El término "alquilenilo C_{x-y}" representa grupos alquilenilo que tienen entre x y y carbonos. Los valores de ejemplo para x son 1, 2, 3, 4 y 5, y los valores de ejemplo para y son 2, 3, 4, 5 y 6. En algunas realizaciones, el alquilenilo puede sustituirse adicionalmente con 1, 2, 3, o 4 grupos sustituyentes como se definen en el presente documento para un grupo alquilo.

Por "alquinilo" se entiende un grupo monovalente de cadena lineal o ramificada de, a menos que se especifique de otra manera, de 2 a 24 átomos de carbono que contienen uno o más triples enlaces carbono-carbono. Los grupos alquinilo se ejemplifican por etinilo, 1-propinilo y similares. El término "alquinilo C_{x-y}" representa grupos alquinilo que tienen entre x y y carbonos. Los valores de ejemplo para x son 2, 3, 4, 5 y 11; para y son 3, 4, 5, 6 y 24; y para x a y son 2 a 10, 2 a 9, 2 a 8, 2 a 7, 2 a 6, 2 a 5, 2 a 4, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 14 a 24, 16 a 24, 18 a 24, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 14 a 22, 16 a 22, 18 a 22, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20, o 18 a 20. En algunas realizaciones, el alquinilo puede estar adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define aquí para un grupo alquilo.

Por "amida" se entiende un grupo amina, como se define en el presente documento, unido al grupo molecular principal a través de un grupo carbonilo.

Por "amino", como se usa en el presente documento, se entiende -N(RN¹)₂, en el que cada RN¹ es, independientemente, H, OH, NO₂, N(R^{N2})₂, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, un grupo protector de N, alquilo, alquenilo, alquinilo, alcoxi, arilo, alcarilo, cicloalquilo, alcicloalquilo, heterocicli (por ejemplo, heteroarilo), alqheterocicli (por ejemplo, alqheteroarilo) o dos RN¹ se combinan para formar un heterocicli o un grupo protector de N, y en donde cada RN² es, independientemente, H, alquilo o arilo. En una realización preferida, amino es -NH₂, o -NHR^{N1}, en donde RN¹ es, independientemente, OH, NO₂, NH₂, NR^{N2}, SO₂OR^{N2}, SO₂R^{N2}, SOR^{N2}, alquilo o arilo, y cada RN² puede ser H, alquilo o arilo. Por "amina primaria" se entiende un grupo que tiene la estructura -NH₂.

El término "aminoalquilo", como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo, como se define en el presente documento, sustituido por un grupo amino, como se define en el presente documento. El alquilo y el amino pueden estar cada uno adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe aquí para el grupo respectivo.

Como se usa en el presente documento, el término "carbamilo" se refiere a un grupo carbamato que tiene la estructura -NR^{N1}C(=O)OR o -OC(=O)N(R^{N1})₂, donde el significado de cada RN¹ se encuentra en la definición de "amino" proporcionado en el presente documento, y R es alquilo, cicloalquilo, alcicloalquilo, arilo, alcarilo, heterocicli (por ejemplo, heteroarilo) o alqheterocicli (por ejemplo, alqheteroestearilo), como se define en el presente documento.

El término "carbonilo", como se usa en el presente documento, representa un grupo C(O), que también puede representarse como C=O.

Por "cicloalquilo" se entiende un sistema de anillo hidrocarburo monocíclico o policíclico (por ejemplo, bicíclico o tricíclico) monovalente saturado o parcialmente insaturado de 3 a 10 miembros. Ejemplos incluyen ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo y cicloheptilo.

El término "halo", como se usa en el presente documento, representa un halógeno seleccionado de bromo, cloro, yodo o flúor.

Por "heteroalquenilo" se entiende un grupo alquenilo, como se define en el presente documento, en el que uno o más de los átomos de carbono constituyentes han sido reemplazados por O, N o S. Los grupos heteroalquenilo de ejemplo incluyen grupos alquenilo, como se describe en el presente documento, sustituido con un grupo oxo y/o unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunas realizaciones, el grupo heteroalquenilo puede estar adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe aquí para grupos alquilo.

5 Por "heteroalquilo" se entiende un grupo alquilo, como se define en el presente documento, en el que uno o más de los átomos de carbono constituyentes han sido reemplazados por O, N o S. Los grupos heteroalquilo de ejemplo incluyen grupos alquilo, como se describe en el presente documento, sustituido con un grupo oxo y/o unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunas realizaciones, el grupo heteroalquilo puede estar adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe aquí para grupos alquilo.

10 El término "heteroalquileno", como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo alquileno, como se define en el presente documento, en el que 1 o 2 de los átomos de carbono constituyentes han sido reemplazados por O, N o S. En algunas realizaciones, el grupo heteroalquileno puede estar además sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe en el presente documento para grupos alquileno. El término "heteroalquileno C_{x-y}" representa grupos heteroalquileno que tienen entre x y y carbonos. Los valores de ejemplo para x son 1, 2, 3, 4, 5 y 11; para y son 2, 3, 4, 5, 6 y 24; y para x a y son 1 a 10, 1 a 9, 1 a 8, 1 a 7, 1 a 6, 1 a 5, 1 a 4, 10 a 24, 11 a 24, 12 a 24, 14 a 24, 16 a 24, 18 a 24, 10 a 22, 11 a 22, 12 a 22, 14 a 22, 16 a 22, 18 a 22, 10 a 20, 11 a 20, 12 a 20, 14 a 20, 16 a 20 o 18 a 20.

15 Por "heteroalquinilo" se entiende un grupo alquinilo, como se define en el presente documento, en el que uno o más de los átomos de carbono constituyentes han sido reemplazados por O, N o S. Los grupos heteroalquinilo de ejemplo incluyen grupos alquinilo, como se describe en el presente documento, sustituido con un grupo oxo y/o unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunas realizaciones, el grupo heteroalquinilo puede estar adicionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se describe aquí para grupos alquilo.

20 El término "heteroarilo", como se usa en el presente documento, representa ese subconjunto de heterociclos, como se define en el presente documento, los cuales son aromáticos: es decir, contienen electrones 4n+2 pi dentro del sistema de anillo mono o multicíclico. En alguna realización, el heteroarilo está sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define para un grupo heterocicilo.

25 El término "heterocicilo", como se usa en el presente documento, representa un anillo de 3, 4, 5, 6, 7 u 8 miembros, a menos que se especifique de otra manera, que contiene uno, dos, tres o cuatro heteroátomos seleccionados independientemente del grupo formado por nitrógeno, oxígeno y azufre. El heterocicilo puede estar saturado o insaturado y contener entre 0 y 3 enlaces insaturados. Por ejemplo, el anillo de 5 miembros tiene cero a dos dobles enlaces, y los anillos de 6 y 7 miembros tienen cero a tres dobles enlaces. Ciertos grupos heterocicilo incluyen de 2 a 9 átomos de carbono, por ejemplo, de 3 a 7 átomos de carbono. Otros de tales grupos pueden incluir hasta 12 átomos de carbono. El término "heterocicilo" también representa un compuesto heterocíclico que tiene una estructura multicíclica puenteada en la que uno o más carbonos y/o heteroátomos conectan dos miembros no adyacentes de un anillo monocíclico, por ejemplo, un grupo quinuclidinilo. Ejemplos de grupos heterocíclicos incluyen aziridinilo, azetidino, pirrolinilo, pirrolidino, pirazolino, pirazolidino, imidazolilo, imidazolinilo, imidazolidinilo, piridilo, pirimidilo, piperidinilo, azepanilo, pirazinilo, piperazinilo, diazepanilo, morfolinilo, tetrahidrofurano, dihidrofurano y similares.

35 El término "(heterocicil)oxi", como se usa en el presente documento, representa un grupo heterocicilo, como se define en el presente documento, unido al grupo molecular original a través de un átomo de oxígeno. En algunas realizaciones, el grupo heterocicilo puede estar sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en el presente documento.

40 El término "(heterocicil)oil", como se usa en el presente documento, representa un grupo heterocicilo, como se define en el presente documento, unido al grupo molecular original a través de un grupo carbonilo. En algunas realizaciones, el grupo heterocicilo puede estar sustituido con 1, 2, 3 o 4 grupos sustituyentes como se define en el presente documento.

El término "hidroxi", como se usa en el presente documento, representa un grupo -OH.

45 Por "enlazador" se entiende un grupo polivalente opcionalmente sustituido (por ejemplo, divalente) que contiene uno o más átomos. Ejemplos de enlazadores incluyen grupos alquileno y heteroalquileno opcionalmente sustituidos, como se describe en el presente documento.

50 El término "grupo protector de N", como se usa en el presente documento, representa aquellos grupos destinados a proteger un grupo amino contra reacciones indeseables durante los procedimientos sintéticos. Los grupos protectores de N comúnmente usados se divulgan en Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3a edición (John Wiley & Sons, Nueva York, 1999). Los grupos protectores de N incluyen grupos acilo, ariloilo o carbamilo tales como formilo, acetilo, propionilo, pivaloilo, t-butilacetilo, 2-cloroacetilo, 2-bromoacetilo, trifluoroacetilo, tricloroacetilo, ftalilo, o-nitrofenoxiacetilo, α-clorobutilo, benzoilo, 4-clorobenzoilo, 4-bromobenzoilo, 4-nitrobenzoilo y auxiliares quirales tales como D, L o D protegidos o no, L-aminoácidos tales como alanina, leucina, fenilalanina y similares; grupos que contienen sulfonilo tales como bencenosulfonilo, p-toluenosulfonilo y similares; grupos formadores de carbamato tales como benciloxicarbonilo, p-clorobenciloxicarbonilo, p-metoxibenciloxicarbonilo, p-nitrobenciloxicarbonilo, 2-nitrobenciloxicarbonilo, p-bromobenciloxicarbonilo, 3,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, oxicarbonilo 3,5-dimetoxibencilo, 2,4-dimetoxibenciloxicarbonilo, 4-metoxibenciloxicarbonilo, 2-nitro-4,5-dimetoxibenciloxicarbonilo, 3,4,5-trimetoxibenciloxicarbonilo, 1-(p-bifenil)-1-metiletoxicarbonilo, α,α-dimetil-3,5-dimetoxibenciloxicarbonilo,

benzidroxycarbonilo, t-butiloxycarbonilo, diisopropilmetoxycarbonilo, isopropiloxycarbonilo, etoxycarbonilo, metoxycarbonilo, aliloxycarbonilo, 2,2,2-tricloroetoxycarbonilo, fenoxycarbonilo, 4-nitrofenoxi carbonilo, fluorenil-9-metoxycarbonilo, ciclopentiloxycarbonilo, adamantiloxycarbonilo, ciclohexiloxycarbonilo, feniltiocarbonilo y similares, grupos alcarilo tales como bencilo, trifenilmetilo, benciloximetilo y similares, y grupos sililo tales como trimetilsililo y similares. Los grupos protectores de N preferidos son formilo, acetilo, benzoilo, pivaloilo, t-butilacetilo, alanilo, fenilsulfonilo, bencilo, t-butiloxycarbonilo (Boc) y benciloxycarbonilo (Cbz).

El término "oxo" como se usa en el presente documento representa =O.

El término "urea" se refiere a un grupo que tiene la estructura $\text{NR}^{\text{N1}}\text{C}(=\text{O})\text{NR}^{\text{N1}}$, donde el significado de cada RN^{N1} se encuentra en la definición de "amino" proporcionada aquí.

10 Por "cantidad suficiente" de un agente se entiende la cantidad del agente suficiente para lograr resultados beneficiosos o deseados, tales como resultados clínicos, y, como tal, una cantidad suficiente depende del contexto en el que se aplica. Por ejemplo, en el contexto de administrar una formulación que reduce el nivel de expresión de un gen diana, la cantidad suficiente de la formulación es una cantidad suficiente para lograr una reducción en el nivel de expresión del gen diana en comparación con la respuesta obtenida sin administración de la formulación.

15 Por "lípidio aniónico" se entiende cualquier molécula lipídica que tiene una carga negativa neta a pH fisiológico.

Como se usa en el presente documento, el término "compuesto antisentido" o "carga útil antisentido" abarca, *inter alia*, oligonucleótidos antisentido monocatenarios (ADN, tipo ADN, ARN, tipo ARN) o ciertos constructos bicatenarios o autohíbridos que comprenden un oligonucleótido de orientación antisentido, PNA antisentido, ribozimas y secuencias de guía externas (secuencias que reclutan RNasa P, como se describe, por ejemplo, en Guerrier-Takada et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 8468, 1997). Los compuestos antisentido pueden ejercer su efecto mediante una variedad de medios. Uno de tales medios es la dirección mediada por antisentido de una nucleasa endógena, tal como RNasa H en eucariotas o RNasa P en procariontes (Chiang et al., J. Biol. Chem. 266: 18162, 1991; Forster et al., Science, 249: 783, 1990).

25 Por "lípidio catiónico" se entiende cualquier molécula lipídica que tenga una carga neta positiva a pH fisiológico. Los lípidos catiónicos de ejemplo incluyen cualquiera de los descritos aquí, por ejemplo, en la Tabla 1.

Por "ARN sustrato de Dicer" o "ARNsiD" se entiende una clase de moléculas de doble cadena de nucleótidos 25-35 (por ejemplo, 25-27, tal como 27) que son capaces de silenciar genes. Debido a su mayor longitud en comparación con otros agentes de iARN, los ARNsiD son probablemente sustratos de Dicer.

30 Por "molécula de doble cadena" se entiende una molécula de ARN:ARN o ARN:ADN de doble cadena que puede usarse para silenciar un producto génico a través de la interferencia de ARN.

Por "expresión" se entiende la detección de un gen o polipéptido por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la expresión de ADN frecuentemente se detecta mediante transferencia Southern o reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y la expresión de ARN frecuentemente se detecta mediante transferencia Northern, RT-PCR, tecnología de arreglo de genes, o ensayos de protección de RNasa. Los métodos para medir el nivel de expresión de proteínas generalmente incluyen, pero no se limitan a, transferencia Western, inmunotransferencia, ensayo inmunoabsorbente enlazado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunoprecipitación, inmunofluorescencia, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF), microcitometría, microscopía, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y citometría de flujo, así como ensayos basados en una propiedad de la proteína que incluye, pero no se limita a, actividad enzimática o interacción con otras asociadas proteicas.

Por "hibridar" se entiende emparejarse para formar una molécula de doble cadena entre polinucleótidos suficientemente complementarios, como se define en el presente documento, o porciones de los mismos, bajo diversas condiciones de restricción. (Véase, por ejemplo, Wahl et al., Methods Enzymol. 152: 399 (1987); Kimmel, Methods Enzymol. 152: 507 (1987)). Por ejemplo, la concentración de sal de alta restricción normalmente será menor que aproximadamente NaCl 750 mM y citrato trisódico 75 mM, menor que aproximadamente NaCl 500 mM y citrato trisódico 50 mM, o menor que aproximadamente NaCl 250 mM y citrato trisódico 25 mM. La hibridación de baja restricción se puede obtener en ausencia de disolvente orgánico, por ejemplo, formamida, mientras que la hibridación de alta restricción se puede obtener en presencia de al menos aproximadamente 35% de formamida o al menos aproximadamente 50% de formamida. Las condiciones de temperatura de alta restricción normalmente incluirán temperaturas de al menos aproximadamente 30 °C, 37 °C o 42 °C. Los expertos en la técnica conocen bien diversos parámetros adicionales, tales como el tiempo de hibridación, la concentración de detergente, por ejemplo, dodecil sulfato de sodio (SDS) y la inclusión o exclusión de ADN portador. Se logran diversos niveles de restricción combinando estas diversas condiciones según sea necesario. En una realización, la hibridación se producirá a 30 °C en NaCl 750 mM, citrato trisódico 75 mM y SDS al 1%. En una realización alternativa, la hibridación ocurrirá a 50 °C o 70 °C en NaCl 400 mM, PIPES 40 mM y EDTA 1 mM, a pH 6.4, después de la hibridación durante 12-16 horas, seguido de lavado. Las condiciones de hibridación preferidas adicionales incluyen hibridación a 70 °C en 1xSSC o 50 °C en 1xSSC, 50% de formamida seguido de lavado a 70 °C en 0.3xSSC o hibridación a 70 °C en 4xSSC o 50 °C en 4xSSC,

- 50% de formamida seguido de lavado a 67 °C en 1xSSC. Las variaciones útiles en estas condiciones serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Una de tales variaciones de ejemplo incluye la evaluación de la hibridación bajo condiciones diseñadas para imitar condiciones intracelulares fisiológicas, en las que los cationes y aniones se clasifican en las siguientes proporciones: para cationes, sodio: potasio: calcio: magnesio a 10:160:2:26; y para aniones, cloruro: bicarbonato: fosfato: sulfato: gluconato a 3:10:100:20:65.
- Por "vector lipídico" se entiende un liposoma, lipoplex, micela, nanopartícula lipídica, partícula basada en núcleo, partícula que comprende un agente de unión a ARN-agregado de ARN que se combina con lípidos de transfección, o partícula basada en vesícula que comprende uno o más compuestos de la invención.
- Por "microARN" (miARN) se entiende una molécula de ARN monocatenario que puede usarse para silenciar un producto génico a través de la interferencia de ARN.
- Por "modular" se entiende que la expresión de un gen, o nivel de una molécula de ARN o moléculas de ARN equivalentes que codifican una o más proteínas o subunidades de proteínas, o la actividad de una o más proteínas o subunidades de proteínas está sobrerregulada o subregulada, de tal manera que la expresión, Nivel o actividad sea mayor o menor que la observada en ausencia del modulador. Por ejemplo, el término modular puede incluir inhibición o silenciamiento génico, y el nivel de expresión de un gen o el nivel de una molécula de ARN, o un equivalente del mismo, se reduce al menos en un 10% (por ejemplo, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100%), en comparación con un control.
- Por "lípidos neutros" se entiende cualquier molécula lipídica que exista bien sea en una forma zwitteriónica no cargada o neutra a pH fisiológico.
- Por "carga útil polianiónica" se entiende una unidad estructural química que comprende múltiples átomos cargados negativamente que pueden ser incorporados en una formulación. Ejemplos de una carga útil polianiónica incluyen ácidos nucleicos, agentes de iARN, siRNA, dsRNA, miRNA, shRNA, ARNSID y cargas útiles antisentido.
- Por "agente de unión a ARN" se entiende cualquier agente o combinación de agentes capaces de unir o hibridar un ácido nucleico, por ejemplo, una carga útil de ácidos nucleicos de una formulación terapéutica. Los agentes de unión a ARN incluyen cualquier lípido descrito aquí (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos, combinaciones de uno o más lípidos catiónicos, tales como los descritos aquí o en la Tabla 1, así como combinaciones de uno o más lípidos catiónicos y cualquier otro lípido, tales como lípidos neutros o conjugados de PEG-lípidos). El agente de unión a ARN puede formar cualquier estructura útil dentro de una formulación, tal como un agregado interno.
- Por "agente de iARN" se entiende cualquier agente o compuesto que ejerza un efecto de silenciamiento génico hibridando un ácido nucleico diana. Los agentes de iARN incluyen cualesquier moléculas de ácidos nucleicos que sean capaces de mediar iARN específico de secuencia (por ejemplo, bajo condiciones restrictivas), por ejemplo, un ARN de interferencia corta (ARNip), ARN bicatenario (ARNbc), microARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), oligonucleótido de interferencia corta, ácido nucleico de interferencia corta, oligonucleótido modificado de interferencia corta, ARNip modificado químicamente, ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgpt) y ARN sustrato de Dicer (ARNsiD).
- Por "ARN de horquilla corta" o "ARNhc" se entiende una secuencia de ARN que hace un giro de horquilla cerrado y es capaz de silenciar genes.
- Por "región en sentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de la invención que tiene suficiente complementariedad con una región antisentido de otro ácido nucleico. Además, la región en sentido de un ácido nucleico de la invención puede incluir una secuencia de nucleótidos que tiene homología con una secuencia de nucleótidos del gen diana. Por "región antisentido" se entiende una secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de la invención que tiene suficiente complementariedad con una secuencia de nucleótidos del gen diana.
- Por "silenciamiento" o "silenciamiento génico" se entiende que la expresión de un gen o el nivel de una molécula de ARN que codifica una o más proteínas se reduce en presencia de un agente de iARN por debajo del observado bajo condiciones de control (por ejemplo, en ausencia del agente de iARN o en presencia de una molécula inactiva o atenuada tal como una molécula de iARN con secuencias mezcladas o con no coincidencias). El silenciamiento génico puede disminuir la expresión del producto génico en 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% o 100% (es decir, inhibición completa).
- Por "ARN inhibidor pequeño", "ARN de interferencia corta" o "ARNip" se entiende una clase de moléculas de doble cadena de nucleótidos de 10-40 (por ejemplo, 15-25, tal como 21) que son capaces de silenciar genes. Más notablemente, LOS ARNiP están típicamente involucrados en la RUTA de interferencia de ARN (iARN) mediante la cual el RNAip interfiere con la expresión de un producto genético específico.
- Por "identidad sustancial" o "sustancialmente idéntico" se entiende un polipéptido o secuencia de polinucleótidos que tiene el mismo polipéptido o secuencia de polinucleótidos, respectivamente, como una secuencia de referencia, o tiene un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos, respectivamente, que son lo mismo en la ubicación correspondiente dentro de una secuencia de referencia cuando las dos secuencias están alineadas de

manera óptima. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia de referencia tiene al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de referencia. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación generalmente será de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 aminoácidos contiguos, más preferiblemente al menos 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300 o 350 aminoácidos contiguos, y lo más preferiblemente la secuencia de aminoácidos de longitud completa. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación generalmente será de al menos 5 nucleótidos contiguos, preferiblemente al menos 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos contiguos, y lo más preferiblemente la secuencia de nucleótidos de longitud completa. La identidad de secuencia se puede medir utilizando un software de análisis de secuencia en la configuración predeterminada (por ejemplo, Paquete de software de Análisis de Secuencia del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software puede coincidir con secuencias similares asignando grados de homología a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones.

Por "suficientemente complementario" se entiende una secuencia de polinucleótidos que tiene la secuencia de polinucleótidos complementaria exacta, como un ácido nucleico diana, o tiene un porcentaje específico o nucleótidos que son el complemento exacto en la ubicación correspondiente dentro del ácido nucleico diana cuando las dos secuencias son alineadas de manera óptima. Por ejemplo, una secuencia de polinucleótidos que es "sustancialmente complementaria" a una secuencia de ácidos nucleicos diana tiene al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de complementariedad con la secuencia de ácidos nucleicos diana. Para los agentes de iARN que tienen una longitud entre 10 y 40 nucleótidos, las secuencias suficientemente complementarias incluyen aquellas que tienen uno, dos, tres, cuatro o cinco nucleótidos no complementarios. De hecho, en ciertas realizaciones que incluyen, por ejemplo, agentes de ARNsID, un agente de iARN bicatenario activo puede poseer tan solo 15 a 19 nucleótidos consecutivos de cadena guía los cuales son suficientemente complementarios a un ácido nucleico diana, mientras que no es un requisito que el resto de la cadena guía posea cualquier grado de complementariedad con el ácido nucleico diana (aunque en ciertas realizaciones, el resto de la cadena guía puede ser parcial o totalmente complementaria con el ácido nucleico (por ejemplo, ARNm) al que se dirige).

Por "ácido nucleico diana" se entiende cualquier secuencia de ácidos nucleicos cuya expresión o actividad se va a modular. El ácido nucleico diana puede ser ADN o ARN. En ciertas realizaciones, el ácido nucleico diana es un ARNm objetivo.

Por "lípidos de transfección" se entiende cualquier lípido o combinación de lípidos capaces de suministrar un ácido nucleico, por ejemplo, una carga útil de ácidos nucleicos (opcionalmente, la carga útil de ácidos nucleicos está asociada con un agente de unión a ARN, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos). Los lípidos de transfección incluyen cualquier lípido descrito aquí (por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos, combinaciones de uno o más lípidos catiónicos, tal como los descritos aquí o en la Tabla 1, así como combinaciones de uno o más lípidos catiónicos y cualquier otro lípido o agente, tales como lípidos neutros, lípidos aniónicos, conjugados de PEG-lípidos o derivados de esteroides). El lípido de transfección o combinaciones que incluyen tal lípido de transfección pueden formar cualquier estructura útil dentro de una formulación, tal como una superficie agregada externa.

Por "composición farmacéutica" se entiende una composición que contiene un compuesto descrito aquí formulado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y fabricado o vendido con la aprobación de una agencia reguladora gubernamental como parte de un régimen terapéutico para el tratamiento de la enfermedad en un mamífero. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse, por ejemplo, para administración oral en forma de dosificación unitaria (por ejemplo, una tableta, cápsula, capsuleta, cápsula de gel o jarabe); para administración tópica (por ejemplo, como crema, gel, loción o ungüento); para administración intravenosa (por ejemplo, como una solución estéril libre de émbolos en partículas y en un sistema solvente adecuado para uso intravenoso); o en cualquier otra formulación descrita aquí.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se entiende cualquier ingrediente distinto de los compuestos descritos en el presente documento (por ejemplo, un vehículo capaz de suspender o disolver el compuesto activo) y que tiene las propiedades de no ser tóxico ni inflamatorio en un paciente. Los excipientes pueden incluir, por ejemplo: antiadherentes, antioxidantes, aglutinantes, recubrimientos, auxiliares de compresión, desintegrantes, colorantes (colores), emolientes, emulsionantes, agentes de relleno (diluyentes), formadores de película o recubrimientos, sabores, fragancias, deslizantes (potenciadores de flujo), lubricantes, conservantes, tintas de impresión, sorbentes, agentes de suspensión o dispersantes, edulcorantes y aguas de hidratación. Los excipientes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a: hidroxitolueno butilado (BHT), carbonato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), estearato de calcio, croscarmelona, polivinilpirrolidona entrecruzada, ácido cítrico, crospovidona, cisteína, etilcelulosa, gelatina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, lactosa, estearato de magnesio, maltitol, manitol, metionina, metilcelulosa, metil parabeno, celulosa microcristalina, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, povidona, almidón pregelatinizado, propilparabeno, palmitato de retinilo, shellac, dióxido de silicio, carboximetil celulosa de sodio, citrato de sodio, almidón glicolato de sodio, sorbitol, almidón (maíz), ácido esteárico, sacarosa, talco, dióxido de titanio, vitamina A, vitamina E, vitamina C y xilitol.

Por "sal farmacéuticamente aceptable" se entiende aquellas sales que, dentro del alcance del buen juicio médico, son adecuadas para uso en contacto con los tejidos de humanos y animales sin toxicidad indebida, irritación, respuesta

alérgica y similares, y son proporcionales con una relación razonable de beneficio/riesgo. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las sales farmacéuticamente aceptables se describen en: Berge et al., J. Pharm. Sci. 66 (1): 1, 1977 y en Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use, P.H. Stahl and C.G. Wermuth (eds.), Wiley-VCH, 2008. Las sales pueden prepararse in situ durante el aislamiento final y la purificación de los compuestos de la invención o por separado haciendo reaccionar el grupo base libre con un ácido orgánico adecuado. Las sales de adición de ácido representativas incluyen sales de acetato, adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, canforato, canforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, hemisulfato, heptonato, hexanoato, bromhidrato, clorhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato, lactobionato, lactato, laurato, laurilsulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes amina, que incluyen, pero no se limitan a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio y similares.

Por "sujeto" se entiende un animal humano o no humano (por ejemplo, un mamífero).

Como se usa aquí, y como se entiende bien en la técnica, "tratamiento" es una metodología para obtener resultados beneficiosos o deseados, tales como resultados clínicos. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero no se limitan a, alivio o mejora de uno o más síntomas o condiciones; disminución de la extensión de la enfermedad, trastorno o condición; estabilización (es decir, no empeoramiento) de un estado de enfermedad, trastorno o condición; prevención de la propagación de enfermedades, trastornos o condiciones; retrasar o ralentizar el progreso de la enfermedad, trastorno o condición; mejora o paliación de la enfermedad, trastorno o condición; y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Paliar" una enfermedad, trastorno o condición significa que la extensión y/o las manifestaciones clínicas indeseables de la enfermedad, trastorno o condición se reducen y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o alarga, en comparación con la extensión o el curso temporal en ausencia de tratamiento. Por "tratar el cáncer", "prevenir el cáncer" o "inhibir el cáncer" se entiende causar una reducción en el tamaño de un tumor o el número de células cancerosas, ralentizar o inhibir un aumento en el tamaño de un tumor o la proliferación de células cancerosas, aumentar el tiempo de supervivencia libre de enfermedad entre la desaparición de un tumor u otro cáncer y su reaparición, previniendo o reduciendo la probabilidad de una aparición inicial o posterior de un tumor u otro cáncer, o reduciendo un síntoma adverso asociado con un tumor u otro cáncer. En una realización deseada, el porcentaje de células tumorales o cancerosas que sobreviven al tratamiento es al menos 20, 40, 60, 80 o 100% menor que el número inicial de células tumorales o cancerosas o cancerosas, medido usando cualquier ensayo estándar. Deseablemente, la disminución en el número de células tumorales o cancerosas inducidas por la administración de un compuesto de la invención es al menos 2, 5, 10, 20 o 50 veces mayor que la disminución en el número de células no tumorales o de células no cancerosas. Deseablemente, los métodos de la presente invención dan como resultado una disminución de 20, 40, 60, 80 o 100% en el tamaño de un tumor o número de células cancerosas, según se determina usando métodos estándar. Deseablemente, al menos el 20, 40, 60, 80, 90 o 95% de los sujetos tratados tienen una remisión completa en la que desaparece toda evidencia de tumor o cáncer. Deseablemente, el tumor o el cáncer no reaparecen o reaparecen después de no menos de 5, 10, 15 o 20 años. Por "tratar profilácticamente" una enfermedad o condición (por ejemplo, cáncer) en un sujeto se entiende reducir el riesgo de desarrollar (es decir, la incidencia) o reducir la gravedad de la enfermedad o condición antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad. El tratamiento profiláctico puede prevenir o reducir por completo la aparición de la enfermedad o un síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El tratamiento profiláctico puede incluir reducir o prevenir una enfermedad o condición (por ejemplo, prevenir el cáncer) en un individuo que puede estar predispuesto a la enfermedad pero que aún no se ha diagnosticado que la tiene.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra los compuestos de amino-amida ("amida marcada") y amino-amina ("amina marcada"). Para estos compuestos, R¹ y R² pueden ser cualquier grupo de cola descrito aquí, tal como alquilo, alquenilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalquenilo o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido. Los ejemplos L30 y L49 son parte del asunto objeto de la presente solicitud.

Las Figuras 2A-2B muestran los compuestos L-1 a L-14.

La Figura 3 muestra los compuestos L-15 a L-21 que tienen una amina terciaria.

La Figura 4 muestra análogos de L-2, incluidos los compuestos L-5, L-6, L-22 y L-23.

La Figura 5 muestra análogos de L-6, incluidos los compuestos L-24 a L-29.

La Figura 6 muestra análogos de amida de L-9, incluidos los compuestos L-30 a L-36.

La Figura 7 muestra los compuestos L-37 a L-41 que tienen un grupo piperazinilo, donde cada R¹ y R² es, independientemente, cualquier grupo de cola descrito aquí, tal como alquilo, alqueniilo, alquinilo, heteroalquilo, heteroalqueniilo o heteroalquinilo C₁₁₋₂₄ opcionalmente sustituido.

La Figura 8 muestra estructuras lipídicas catiónicas de amino amina adicionales L-42, L-43 y L-44.

5 La Figura 9 muestra otras estructuras lipídicas catiónicas L-6, L-45, L-46 y L-47.

La Figura 10 es un gráfico que muestra la anulación in vitro de partículas lipídicas que contienen compuestos L-1 o L-2, en comparación con un control no tratado.

10 La Figura 11 es un gráfico que muestra la anulación in vivo de ARNm de HPRT1 en el hígado de ratón usando una dosis única de partículas lipídicas que incluyen L-1, L-2, L-5, L-6, L-7, L-8, L-22, o L-30 y 5 mg/kg de ARNsiD seguido de recolección de tejido después de 48 horas.

La Figura 12 es un gráfico que muestra la anulación in vivo del ARNm de HPRT1 en el hígado de ratón usando una dosis única de partículas lipídicas que incluyen L-2, L-5, L-6 o L-30 y 1 mg/kg o 5 mg/kg de ARNsiD seguido de recolección de tejido después de 48 horas.

15 La Figura 13 es un gráfico que muestra la anulación in vivo de ARNm de HPRT1 en hígado de ratón y tumor ortopédico Hep3B usando dos dosis de partículas lipídicas formuladas con L-6 o L-30 y 5 mg/kg de ARNsiD seguido de recolección de tejido después de 48 horas.

La Figura 14 es un gráfico que muestra la anulación in vivo del ARNm de HPRT1 en el hígado de ratón y el tumor HepG2 ortotópico utilizando dos dosis de partículas lipídicas formuladas con L-6 o L-30 y 5 mg/kg de ARNsiD seguido de recolección de tejido después de 48 horas.

20 La Figura 15 es un gráfico que muestra el efecto de las formulaciones de partículas lipídicas L-6 y L-30 con un ARNsiD activo ("L-6 Activo" y "L-30 Activo") sobre los niveles séricos de α -fetoproteína (AFP) en modelo Hep3B in vivo. Se proporcionan controles para formulaciones sin ARNsiD ("Control L-6" y "Control L-30") y regulador ("PBS").

25 La Figura 16 es un gráfico que muestra el efecto de las formulaciones de partículas lipídicas L-6 y L-30 con un ARNsiD activo ("L-6 Activo" y "L-30 Activo") sobre el peso del tumor en un modelo Hep3B in vivo. Se proporcionan controles para formulaciones sin ARNsiD ("Control L-6" y "Control L-30") y regulador ("PBS").

La Figura 17 muestra los compuestos L-48 y L-49 que tienen grupos de cola de dioleilo.

30 La Figura 18 es un gráfico que muestra la anulación in vivo del ARNm de HPRT1 en el hígado de ratón y el tumor Hep3B ortotópico (0.5 g \pm 0.1) usando una dosis IV única de partículas lipídicas que incluyen L-30 y 1, 3 o 10 mg/kg de ARNsiD seguido de recolección de tejidos después de 48 horas. N = 7/grupo hígado y tumor (media con SEM). Se probaron dos formulaciones: L-30 [1] y L-30 [2], como se describe aquí.

35 La Figura 19 es un gráfico que muestra la anulación in vivo del ARNm de HPRT1 en modelos de cáncer de hígado ortotópico múltiple utilizando una dosis única de partículas lipídicas con la formulación L-30 [1] y ARNsiD. Los modelos Hep3B y HepG2 se implantaron como suspensiones celulares; y HuH1, HuH7 y MHCC97H se implantaron como fragmentos de trocar. N = 5-7/grupo, IV a 5 mg/kg, Q2Dx1. La anulación de objetivos en todos los grupos fue significativa en relación con PBS (p < 0.05).

La Figura 20 es un gráfico que muestra la anulación in vivo de diversos ARNm en un modelo de tumor ortopédico Hep3B HCC utilizando una dosis única de partículas lipídicas con la formulación L-30 [1] y diversos ARNsiD independientes. N = 6-7/grupo, IV a 5 mg/kg, TIWx2; todos con sorafenib se administraron por vía oral a 10 mg/kg, QDx14. ** = p < 0.01, * = p < 0.05.

40 La Figura 21 es un gráfico que muestra la eliminación in vivo de ARNm de HPRT1 en tejidos tumorales de Hep3B HCC con una dosis única de partículas lipídicas que contienen 5 mg/kg de ARNsiD en siete formulaciones diferentes de L-30 ([A] a [G]) seguido de tejido recolectado después de 72 horas. Los valores en la barra con error representan la media + SEM (N = 7/grupo).

45 La Figura 22 es un gráfico que muestra la anulación in vivo de ARNm de HPRT1 en tejidos de tumor de pulmón de xenoinjerto SC NSCLC H1975 con una dosis de partículas lipídicas que contienen 10 mg/kg de ARNsiD en los días 1 y 3 en dos formulaciones, L-6 [2] y L-30 [2], seguido de recolección de tejidos en el día 5. Los valores en la barra con error representan la media + SEM (N = 7/grupo).

50 La Figura 23 es un gráfico que muestra la anulación in vivo de ARNm de HPRT1 en xenoinjerto SC de cáncer de próstata 22Rv1 con una dosis de partículas lipídicas que contienen 10 mg/kg de ARNsiD en los días 1 y 3 en dos formulaciones, L-6 [2] y L-30 [2], seguido de recolección de tejido en el día 5. Los valores en la barra con error representan la media + SEM (N = 7/grupo).

La Figura 24 es un gráfico que muestra la anulación in vivo del ARNm de HPRT1 en el cáncer de próstata 22Rv1 implantado en el hígado con una dosis de partículas lipídicas que contienen 10 mg/kg de ARNsID en los días 1 y 3 en tres formulaciones, L-6 [1], L-30 [A] y L-30 [E], seguido de recolección de tejido en el día 5. Los valores en la barra con error representan la media + SEM (N = 7/grupo).

5 Descripción detallada

Ahora se han desarrollado lípidos catiónicos de amino-amina y amino-amida que pueden formularse en partículas lipídicas. Las formulaciones de la invención pueden usarse para el suministro de una carga útil polianiónica (por ejemplo, moléculas de ácido nucleico o agentes de iARN) a las células (por ejemplo, in vitro o in vivo en un sujeto). El suministro de la carga útil polianiónica puede lograr el silenciamiento génico de secuencia específica en las células.

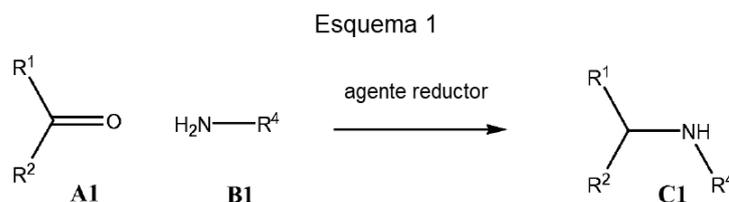
10 Lípidos de amino-amina y amino-amida

En realizaciones particulares, el compuesto se selecciona de la Tabla 1.

Tabla 1.

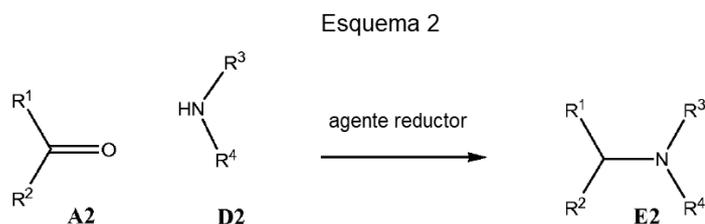
L-30	
L-49	

15 Los compuestos de la invención (por ejemplo, como se proporciona en la Tabla 1) pueden prepararse mediante procesos análogos a los establecidos en la técnica, por ejemplo, mediante las secuencias de reacción mostradas en los Esquemas 1-4. Los lípidos producidos por estas secuencias de reacción, o modificaciones de los mismos, se proporcionan en las Figuras 1-9 y Figura 17.

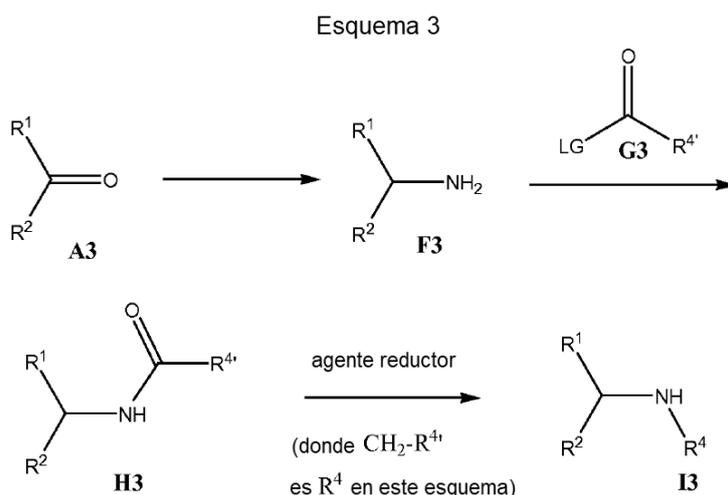


20 La amina secundaria de fórmula C1 puede prepararse bajo condiciones de aminación reductora tratando la cetona A1, donde R¹ y R² es un grupo de cola lipídica, como se describe aquí, con una amina primaria B1, en donde R⁴ se describe aquí. Las condiciones para la aminación reductora incluyen combinar la cetona A1 y la amina primaria B1 con un agente reductor, tal como el cianoborohidruro de sodio o el trioacetoxiborohidruro de sodio, en un disolvente apropiado. El lípido de amino-amina de C1 se oxida adicionalmente para formar un lípido de amino-amida correspondiente que tiene un grupo oxo en el carbono en R³ que es adyacente al nitrógeno. En otras realizaciones, el lípido de amino-amina de C1 está sujeto adicionalmente a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴. Los compuestos de ejemplo que se pueden producir usando este esquema se proporcionan en la Figura 1.

25

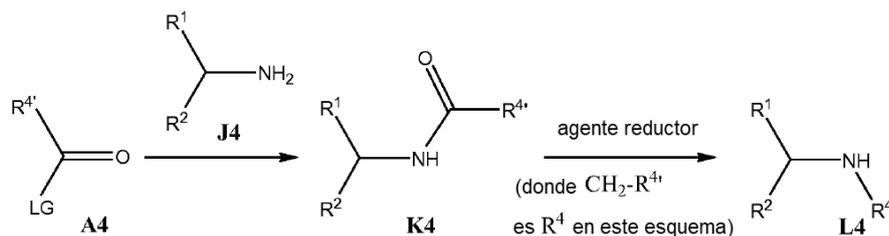


La amina terciaria de fórmula E2 se puede preparar bajo condiciones de aminación reductora tratando la cetona A2, donde cada R¹ y R² es un grupo de cola lipídica, como se describe en el presente documento, con una amina secundaria D2, donde se describe R³ y R⁴ en el presente documento. Las condiciones para la aminación reductora incluyen combinar la cetona A2 y la amina secundaria D2 con un agente reductor, tal como el cianoborohidruro de sodio o el trioacetoxiborohidruro de sodio, en un disolvente apropiado. En algunas realizaciones de D2, R³ y R⁴ se unen para formar un anillo heterocíclico que contiene uno o más heteroátomos, y la amina terciaria resultante E2 incluye tales grupos R³ y R⁴. En realizaciones particulares, el lípido de amino-amina de E2 se oxida adicionalmente para formar un lípido de amino-amida correspondiente que tiene un grupo oxo en un carbono en R³ o R⁴ que es adyacente al nitrógeno. En otras realizaciones, el lípido de amino-amina de E2 está sujeto adicionalmente a alquilación en cualquier carbono en R³ y/o R⁴.



La amina de fórmula F3 se puede preparar combinando cetona A3, amoníaco, dihidrógeno y un catalizador en un disolvente apropiado, opcionalmente, bajo alta presión. El lípido de amino-amida de fórmula H3 puede prepararse combinando la amina F3 con un ácido carboxílico activado G3 en un disolvente apropiado, donde LG es un grupo saliente y R⁴ se describe aquí. Los LG de ejemplo incluyen halo (por ejemplo, cloruro, bromo o yodo), tosilato y triflato. El lípido de amino-amina de I3 se puede preparar combinando la amida H3 con un agente reductor (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio, borano-tetrahidrofurano o borano-dimetilsulfuro). En realizaciones particulares, el lípido de amino-amida de H3 está sujeto adicionalmente a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴. En otras realizaciones, el lípido de amino-amina de I3 está sujeto adicionalmente a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴.

Esquema 4



5 El lípido de amino-amida de fórmula K4 se puede preparar combinando la cetona A4 y la amina J4 en un disolvente apropiado, donde LG es un grupo saliente y R¹, R² y R⁴ se describen aquí. Los LG de ejemplo incluyen halo (por ejemplo, cloruro, bromo o yodo), tosilato y triflato. El lípido de amino-amina de L4 se puede preparar combinando la amida K4 con un agente reductor (por ejemplo, hidruro de litio y aluminio, borano-tetrahidrofurano o borano-dimetilsulfuro). En otras realizaciones, el lípido de amino-amida de K4 está sujeto adicionalmente a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴⁺. En otras realizaciones, el lípido de amino-amina de L4 está sujeto adicionalmente a alquilación en el nitrógeno o en cualquier carbono en R⁴. Los compuestos de ejemplo producidos por este método se proporcionan en la Figura 7.

10 En cualquiera de los esquemas anteriores, R⁴ puede ser heterociclilo opcionalmente sustituido, -L¹-NR⁵R⁶⁵ opcionalmente sustituido, -C(O)-L¹-NR⁵R⁶ opcionalmente sustituido, o -L¹-heterociclilo opcionalmente sustituido, como se describe en el presente documento.

15 En cualquiera de los esquemas anteriores, los compuestos pueden alquilarse adicionalmente para introducir un alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido en N (es decir, R³ es un alquilo C₁₋₆ opcionalmente sustituido) para formar una amina terciaria. En la Figura 3 se proporcionan compuestos de ejemplo que tienen una amina terciaria.

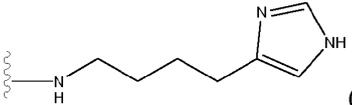
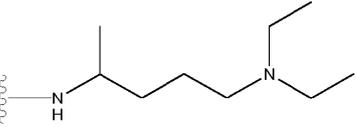
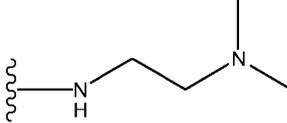
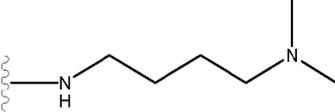
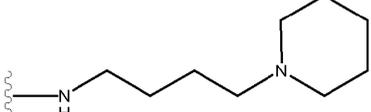
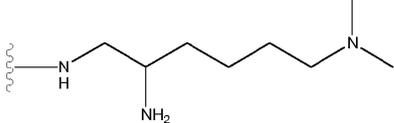
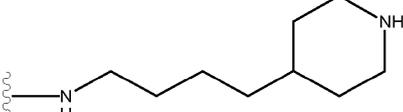
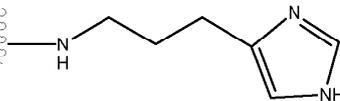
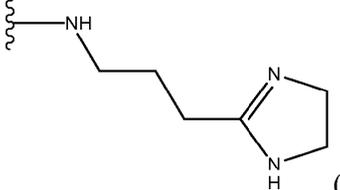
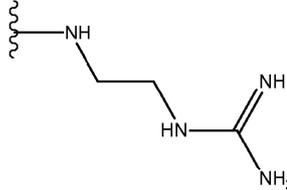
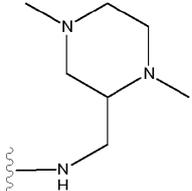
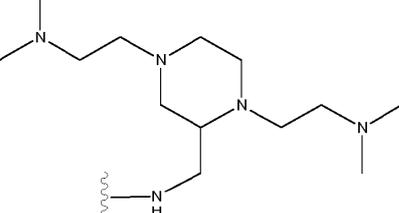
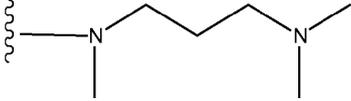
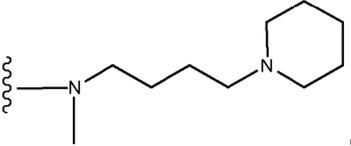
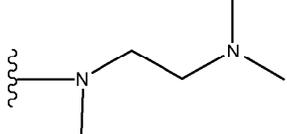
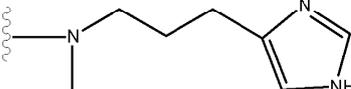
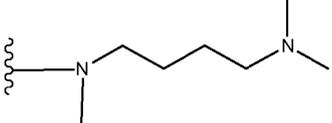
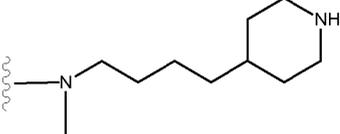
Cualquiera de los lípidos descritos aquí, por ejemplo, como en las Figuras 1-9 y Figura 17, puede producirse aplicando los esquemas sintéticos proporcionados anteriormente o en los Ejemplos 1-5 y, si es necesario, haciendo modificaciones conocidas por un experto en la técnica.

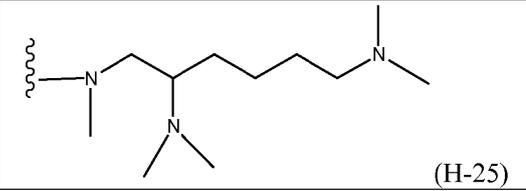
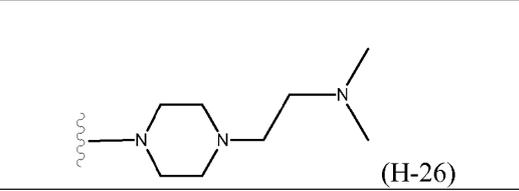
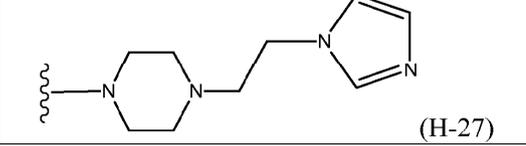
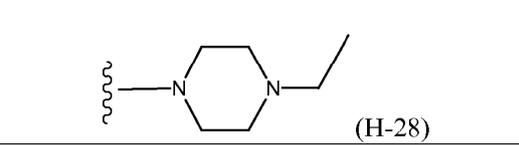
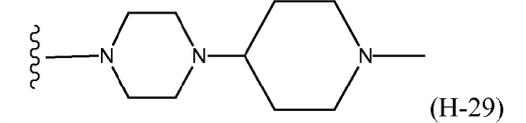
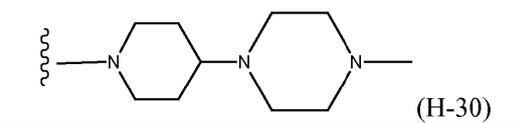
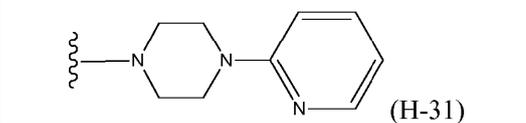
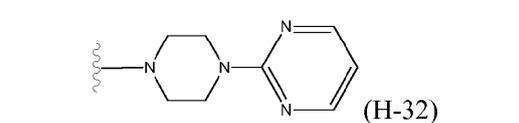
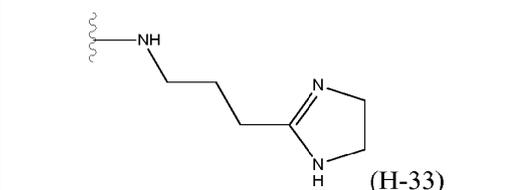
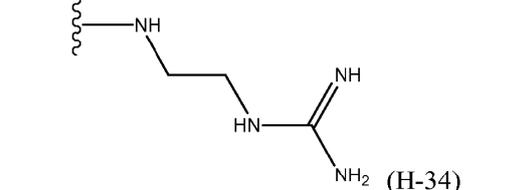
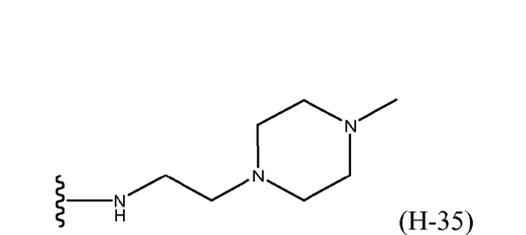
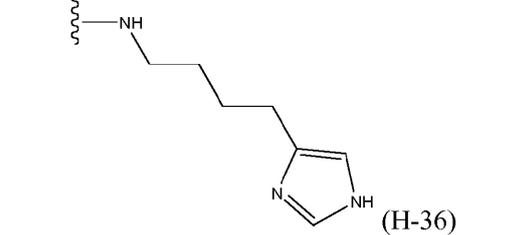
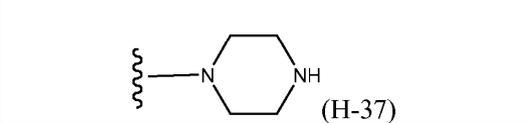
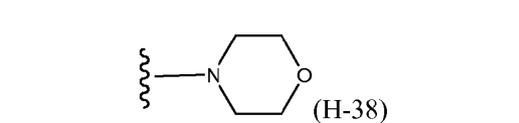
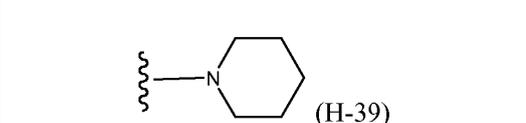
Grupos de cabeza de lípidos

20 En la Tabla 2 se proporciona una lista de grupos de cabeza (no según la invención) que tienen un grupo amina.

Tabla 2: Grupos de cabeza de lípidos

<p>(H-1)</p>	<p>(H-2)</p>
<p>(H-3)</p>	<p>(H-4)</p>
<p>(H-5)</p>	<p>(H-6)</p>

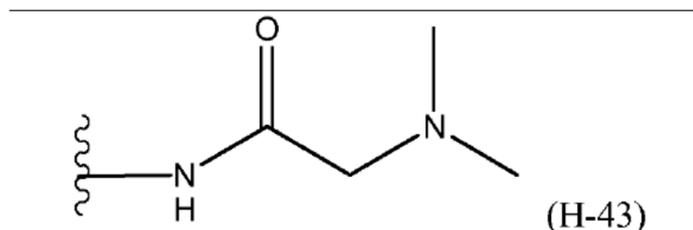
 <p>(H-7)</p>	 <p>(H-8)</p>
 <p>(H-9)</p>	 <p>(H-10)</p>
 <p>(H-11)</p>	 <p>(H-12)</p>
 <p>(H-13)</p>	 <p>(H-14)</p>
 <p>(H-15)</p>	 <p>(H-16)</p>
 <p>(H-17)</p>	 <p>(H-18)</p>
 <p>(H-19)</p>	 <p>(H-20)</p>
 <p>(H-21)</p>	 <p>(H-22)</p>
 <p>(H-23)</p>	 <p>(H-24)</p>

 (H-25)	 (H-26)
 (H-27)	 (H-28)
 (H-29)	 (H-30)
 (H-31)	 (H-32)
 (H-33)	 (H-34)
 (H-35)	 (H-36)
 (H-37)	 (H-38)
 (H-39)	

El grupo de cabeza H-43 (de acuerdo con la invención) en la Tabla 3, se puede combinar con cualquiera de los grupos de cola descritos aquí, por ejemplo, en la Tabla 4, a través de la pieza de cabeza > CH- para formar un compuesto de la invención.

5

Tabla 3: Grupo de cabeza de lípidos que contienen una amida



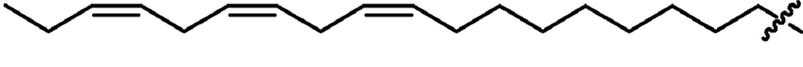
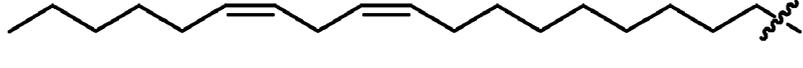
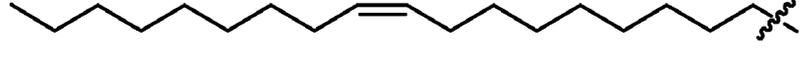
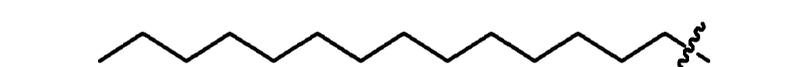
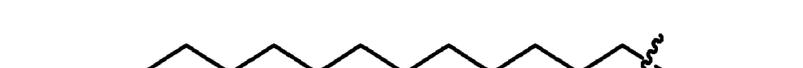
Grupos de cola lipídica

Para cada compuesto, los grupos de cola pueden ser iguales o diferentes.

Los ejemplos de grupos de cola incluyen grupos saturados e insaturados que tienen carbono, tal como linolenilo (C18:3) o linoleilo (C18:2). En la Tabla 4 se proporciona una lista no limitante adicional de grupos de cola lipídica.

5

Tabla 4: Ejemplos de grupos de cola de lípidos

linolenilo (C18:3)	
linoleilo (C18:2)	
oleilo (C18:1)	
estearilo (18:0)	
palmitilo (16:0)	
miristilo (14:0)	
laurilo (12:0)	

Formulaciones

Los compuestos de la invención pueden combinarse con una o más moléculas de lípidos (por ejemplo, lípidos catiónicos, aniónicos o neutros) para producir una formulación. La formulación también puede incluir uno o más componentes (por ejemplo, derivados de esteroides, conjugados de PEG-lípidos, conjugados de poliamida-lípidos, gangliósidos, antioxidantes, surfactantes, agentes anfífilicos o sales) y/o una o más cargas útiles polianiónicas (por ejemplo, uno o más ácidos nucleicos o agentes de iARN). Se han descrito métodos para formular lípidos para incorporar cargas útiles de ácidos nucleicos, véase, por ejemplo, Judge et al., J. Clin. Invest. 119(3):661, 2009; Noble et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 64(4):741, 2009; Abrams et al., Mol. Ther. 18(1):171, 2009; Yagi et al., Cancer Res. 69(16):6531, 2009; Ko et al., J. Control. Release 133(2):132, 2009; Mangala et al., Methods Mol. Biol. 555:29, 2009.

Formulaciones con más de una molécula lipídica.

Las formulaciones de la invención pueden incluir cualquier combinación útil de moléculas de lípidos (por ejemplo, un compuesto de la invención, un lípido catiónico (que incluye opcionalmente uno o más lípidos catiónicos, por ejemplo, uno o más lípidos catiónicos de la invención como se describe aquí y/u opcionalmente incluye uno o más lípidos catiónicos conocidos en la técnica), un lípido neutro, un lípido aniónico y un conjugado de PEG-lípido), incluidos los conjugados polipéptido-lípido y otros componentes que ayudan en la formación o estabilidad de un vector lipídico, como se describe aquí. Un experto en la técnica sabrá cómo optimizar la combinación que favorece la encapsulación

20

de un agente particular, la estabilidad de la formulación lipídica, las condiciones de reacción aumentadas o cualquier otro factor pertinente. Las formulaciones de la invención pueden incluir otros componentes que ayudan en la formación o estabilidad.

5 El porcentaje de cada componente en la formulación puede equilibrarse para producir un vector lipídico capaz de encapsular un agente de iARN y transfectar el agente en una célula. Una formulación de ejemplo incluye de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más compuestos de la invención, de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más lípidos catiónicos, de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos, de aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 20% en moles de uno o más lípidos neutros, y de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más derivados de esteroides. En realizaciones particulares, la formulación incluye de aproximadamente 20% en moles a aproximadamente 25% en moles (por ejemplo, aproximadamente 21.0% en moles, 21.2% en moles, 21.4% en moles, 21.6% en moles, 21.8% en moles o 22% en moles) de uno o más compuestos de la invención, de aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 30% en moles (por ejemplo, aproximadamente 25.1% en moles, 25.2% en moles, 25.3% en moles, 25.4% en moles, 25.5% en moles, 25.6% en moles, 25.7% en moles, 25.8% en moles, 25.9% en moles, 26.0% en moles, 26.2% en moles, 26.4% en moles, 26.6% en moles, 26.8% en moles o 27% en moles) de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA), de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 15 % en moles (por ejemplo, aproximadamente 13.0% mol, 13.2% mol, 13.4% mol, 13.6% mol, 13.8% mol, 14% mol, 14.1% mol, 14.3% mol, 14.5% mol, 14.7% mol, o 14.9% mol) de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC), de aproximadamente 2.5% en moles a aproximadamente 10% en moles (por ejemplo, aproximadamente 2.5% en moles, 2.6% en moles, 2.7% en moles, 2.8% en moles, 2.9% en moles, 3% en moles) , 3.5 % en moles, 4% en, 4.3 % en moles, 4.5 % en moles, 4.7 % en moles, 5 % en moles, 5.3 % en moles, 5.5 % en moles, 5.7 % en moles, 6 % en moles, 6.5 % en moles, 6.7 % en moles, 7 % en moles, 7.5% en moles, 8% en moles, 8,5 % en moles, o 9% en moles) de uno o más conjugados de PEG-lípidos (por ejemplo, alrededor de 2.8% en moles, 2.9% en moles, 3.0% en moles, 3.5% en moles, 3.7% en moles, 3.9% en moles, 4% en moles, 4.1 % en moles, 4.3 % en moles, 4.5% mol, 4.7% mol, 4.9% mol, 5% mol, 5.1% mol, 5.3% mol, 5.5% mol, 5.7% mol, 5.9% mol, 6% mol, 6.3% mol, 6.5% en moles, 6.7% en moles o 7% en moles de PEG2000-DSPE y/o PEG2000-DMPE y/o 3% en moles, 3.5% en moles, 3.7% en moles, 3.9% en moles, 4% en moles, 4.1% en moles, 4.3 % mol, 4.5% en moles, 4.7% en moles, 4.9% en moles, 5% en moles, 5.1% en moles, 5.3% en moles, 5.5% en moles, 5.7% en moles, 5.9% en moles, 6% en moles, 6.3% en moles, 6.5% mol , 6.7% en moles, o 7% en moles de PEG2000-DMG), y aproximadamente 25% en moles a aproximadamente 35% en moles (por ejemplo, aproximadamente 28,4% en moles, 28,6% en moles, 28,8% en moles, 29,0% en moles, 30% en moles, 31 % en moles, 32% en moles, 33% en moles, 33.2% en moles, 33.4% en moles, 33.6% en moles, 33.8% en moles, 34% en moles, 34.4% en moles, 34.7% en moles, o 34.9% en moles de un derivado de esteroides (por ejemplo, colesterol).

35 La formulación puede incluir cualquier cantidad útil de uno o más lípidos catiónicos. En algunas realizaciones, el contenido del lípido catiónico en la formulación es de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 10% en moles a 15% en moles, de aproximadamente 15% en moles a 20% en moles, de aproximadamente 20 % en moles a 25% en moles, de aproximadamente 25% en moles a 30% en moles, de aproximadamente 30% en moles a 35% en moles y de aproximadamente 35% en moles a 40% en moles). En realizaciones particulares, se usan lípidos catiónicos mixtos (por ejemplo, 10,8% en moles de L-1 y 10.8% en moles de L-2).

45 En algunas realizaciones, la formulación incluye partículas lipídicas que tienen uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección, donde el uno o más agentes de unión a ARN incluyen aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más lípidos catiónicos (por ejemplo, DODMA) y aproximadamente 0.5% en moles a aproximadamente 10% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, tal como PEG2000-DMPE); y donde el uno o más lípidos de transfección incluyen aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles de uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, L-6, -30, o cualquiera en la Tabla 1), aproximadamente 5% en moles a aproximadamente 20 % en moles de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC), aproximadamente 0.5% en moles a aproximadamente 10% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, por ejemplo, PEG2000-DMPE), y aproximadamente del 20% en moles a aproximadamente el 40% en moles de uno o más derivados de esteroides (por ejemplo, colesterol).

55 Los agentes de unión a ARN de una partícula lipídica puede incluir una combinación de cualquier lípido y conjugado útil. En realizaciones particulares, el contenido del lípido catiónico (por ejemplo, DODMA) es de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 20% en moles a 40% en moles, 20% en moles a 35% en moles, 20% en moles a 30 % en moles, 15 % en moles a 40 % en moles, 15 % en moles a 35 % en moles, 15 % en moles a 25 % en moles, o 15 % en moles a 20 % en moles). En algunas realizaciones, el conjugado de PEG-lípido (por ejemplo, PEG-DSPE, tal como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, tal como PEG2000-DMPE) es de aproximadamente 0.5% en moles a aproximadamente 10% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 0.5 % en moles a 1 % en moles, 0.5 % en moles a 5 % en moles, 0.5 % en moles, a 10 % en moles, 1 % en moles a 60 5 % en moles, o 1 % en moles a 10 % en moles).

Los lípidos de transfección de una partícula lipídica pueden incluir una combinación de cualquier lípido y conjugado útil. En realizaciones particulares, el contenido de uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, L-6, -30, o

5 cualquiera en la Tabla 1) es de aproximadamente 10% en moles a aproximadamente 40% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 10% en moles a 20 % en moles, 10 % en moles a 30 % en moles, 10 % en moles a 35 % en moles, 15 % en moles a 20 % en moles, 15 % en moles a 25 % en moles, 15 % en moles a 30 % en moles, 15 % en moles a 35 % en moles, 15 % en moles a 40 % en moles, 20 % en moles a 25 % en moles, 20 % en moles a 30 % en moles, 20 % en moles a 35 % en moles, 20 % en moles a 40 % en moles, 25 % en moles a 30 % en moles, 25% en moles a 35% en moles, o 25% en moles a 40% en moles). En algunas realizaciones, el contenido de uno o más lípidos neutros (por ejemplo, DSPC) es de aproximadamente 5 % en moles a aproximadamente 20 % en moles (por ejemplo, de aproximadamente 5 % en moles a 10 % en moles, 5 % en moles a 15 % en moles, 7 moles % a 10 % en moles, 7 % en moles a 15 % en moles, 7 % en moles a 20 % en moles, 10 % en moles a 15 % en moles, o 10 % en moles a 20 % en moles). En algunas realizaciones, el contenido de uno o más conjugados de PEG-lípidos (por ejemplo, PEG-DSPE, como PEG2000-DSPE, y/o PEG-DMPE, como PEG2000-DMPE) es de aproximadamente 0.5% en moles a aproximadamente 10% en moles. (por ejemplo, de aproximadamente 0.5 % en moles a 1 % en moles, 0.5 % en moles a 5 % en moles, 0.5 % en moles, a 10 % en moles, 1 % en moles a 5 % en moles, o 1 % en moles a 10 % en moles). En algunas realizaciones, el contenido de uno o más derivados de esteroides (por ejemplo, colesterol) es de aproximadamente 20 % en moles a aproximadamente 40 % en moles (por ejemplo, de aproximadamente 20 % en moles a 25 % en moles, 20 % en moles a 30 % en moles, 20 moles % a 35 % en moles, 20 % en moles a 40 % en moles, 25 % en moles a 30 % en moles, 25 % en moles a 35 % en moles, o 25 % en moles a 40 % en moles).

20 En otras realizaciones, los compuestos de la invención se usan en la formulación de los agentes de unión a ARN (por ejemplo, aproximadamente 25.9% en moles de L-6, L-30, L-48 o L-49). En realizaciones particulares, el compuesto de la invención utilizado en la formulación de los agentes de unión a ARN es diferente del compuesto de la invención utilizado en la formulación de los lípidos de transfección (por ejemplo, 25.9% en moles de L-48 como agente de unión a ARN, y 21.6% en moles de L-30 como lípido de transfección). En algunas realizaciones de la formulación, el uno o más agentes de unión a ARN forman un agregado interno, y el uno o más lípidos de transfección forman una superficie agregada externa. En realizaciones particulares, la superficie agregada externa no es una membrana, una bicapa lipídica y/o una capa multilamelar.

30 La formulación también puede incluir cualquier cantidad útil de uno o más conjugados de PEG-lípidos. En algunas realizaciones, el contenido del conjugado de PEG-lípido en la formulación es de aproximadamente 1% en moles y aproximadamente 20% en moles (por ejemplo, de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 2% en moles, de aproximadamente 2% en moles a aproximadamente 4% en moles, de aproximadamente 2 % en moles a aproximadamente 7 % en moles, de aproximadamente 4 % en moles a aproximadamente 8 % en moles, de aproximadamente 8 % en moles a aproximadamente 12 % en moles, de aproximadamente 12 % en moles a aproximadamente 16 % en moles, o de aproximadamente 16 moles % a aproximadamente 20 % en moles). En otras realizaciones, el contenido de conjugado de PEG-lípido es de aproximadamente 7% en moles, 6% en moles, 3.0% en moles o 2.5% en moles. Además, el contenido de lípidos de PEG puede variar de aproximadamente 1% en moles a aproximadamente 20% en moles, mediante el ajuste apropiado del contenido de DSPC o colesterol, o ambos. El lípido de PEG puede variarse usando C14:0 (como en la Tabla 4, por ejemplo, PEG-DSPE o PEG-DMPE, etc.), C16 (PEG-DPPE, PEG-DPG, etc.), C18:0 (PEG-DSPE, PEG-DSG, etc.) o C18:1 (PEG-DOPE, PEG-DOG, etc.). Adicionalmente, se pueden usar unidades estructurales de PEG de diferente peso molecular (PEG2000, PEG3400, PEG5000, etc.). En realizaciones particulares, se usan conjugados de PEG mixtos, como se describe en el presente documento. En 40 realizaciones particulares, se usa PEG2000-DSPE. En realizaciones particulares, se usa PEG2000-DMPE.

Formulaciones con agentes de iARN

45 Las formulaciones de la invención pueden formularse con un lípido catiónico de amino-amina y/o un lípido de amino-amida con un agente de iARN por cualquiera de los métodos descritos aquí. Por ejemplo, véase: Judge et al., J. Clin. Invest. 119(3):661, 2009; Noble et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 64(4):741, 2009; Abrams et al., Mol. Ther. 18(1):171, 2009; Yagi et al., Cancer Res. 69(16):6531, 2009; Ko et al., J. Control. Release 133(2):132, 2009; Mangala et al., Methods Mol. Biol. 555:29, 2009.

50 La formulación puede incluir un agente de iARN y una molécula lipídica y/o uno o más componentes en cualquier proporción útil. Las relaciones de ejemplo incluyen una relación (p/p) de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:100 (p/p) (por ejemplo, de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:50, por ejemplo, aproximadamente 1:20) de relación agente de iARN:lípido total, donde la relación lipídica total es el peso de la combinación de una o más moléculas lipídicas (por ejemplo, lípidos catiónicos, aniónicos o neutros) y uno o más componentes (por ejemplo, derivados de esteroides, conjugados PEG-lípidos, conjugados de poliamida-lípidos, gangliósidos, antioxidantes, surfactantes, agentes anfífilicos o sales).

55 La formulación puede incluir un agente de iARN en una dosis que varía de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de cualquier agente de iARN descrito aquí. Las dosis de ejemplo incluyen 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, 6 mg/kg, 7 mg/kg, 8 mg/kg, 9 mg/kg y 10 mg/kg de un agente de iARN en la formulación.

Métodos de preparación de formulaciones.

Las formulaciones de la invención se pueden preparar con cualquier proceso útil. En un procedimiento de ejemplo, los componentes de la formulación (por ejemplo, uno o más agentes de unión a ARN, lípidos de transfección o cualquier lípido descrito aquí) se disuelven en un disolvente (por ejemplo, un disolvente acuoso, un disolvente no acuoso o mezclas de disolvente de los mismos). La suspensión lipídica resultante se puede filtrar opcionalmente, mezclar (por ejemplo, mezclar por lotes, mezclar en línea y/o someter a vórtex), evaporar (por ejemplo, usando una corriente de nitrógeno o argón), resuspender (por ejemplo, en un disolvente acuoso, un solvente no acuoso, o mezclas de solventes de los mismos), congelar-descongelar, extrudir y/o sonicar. Además, la suspensión de lípidos puede procesarse opcionalmente agregando cualquier componente deseado (por ejemplo, uno o más agentes de ARNi, agentes de unión a ARN, lípidos de transfección y/ o cualquier lípido descrito en este documento) para producir una suspensión final. El uno o más componentes deseados se pueden proporcionar en el mismo o diferente disolvente que la suspensión. Por ejemplo, la suspensión de lípidos se puede proporcionar en un primer disolvente o sistema de disolvente (por ejemplo, uno o más disolventes acuosos o no acuosos, tales como agua, agua-HCl, agua-etanol, regulador (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Earle (EBSS), carbonato, lactato, ascorbato y citrato, tal como 5 mM, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM o 150 mM)), solución fisiológica de osmolalidad (290 mOsm/kg, por ejemplo, solución salina al 0.9%, dextrosa al 5% y sacarosa al 10%), solución salina, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, tert-butanol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, cloroformo, diclorometano, hexano, ciclohexano, acetona, éter, éter dietílico, dioxano, éter isopropílico, tetrahidrofurano o sus combinaciones), y el agente de iARN puede proporcionarse en un segundo disolvente o sistema de disolvente, por ejemplo, uno o más disolventes acuosos o no acuosos, tales como agua, agua-HCl, agua-etanol, regulador (por ejemplo, solución salina regulada con fosfato (PBS), solución salina equilibrada de Hank (HBSS), solución salina regulada con fosfato de Dulbecco (DPBS), solución salina equilibrada de Earle (EBSS), carbonato, lactato, ascorbato y citrato, tal como 5 mM, 10 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM o 150 mM)), solución de osmolalidad fisiológica (290 mOsm/kg, por ejemplo, solución salina al 0.9%, dextrosa al 5% y sacarosa al 10%), solución salina, metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, tert-butanol, glicerol, etilenglicol, propilenglicol, polietilenglicol, cloroformo, diclorometano, hexano, ciclohexano, acetona, éter, éter dietílico, dioxano, isopropilo éter, tetrahidrofurano o combinaciones de los mismos). Las concentraciones de ejemplo de disolventes y/o reguladores acuosos incluyen de aproximadamente 4% a aproximadamente 8% de etanol (por ejemplo, de aproximadamente 4% a 5%, 5% a 6%, 6%, a 7% o 7% a 8%), de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de citrato (por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a 30 mM, de 30 mM a 50 mM, de 50 mM a 70 mM, de 70 mM a 90 mM o de 90 mM a 100 mM). Cualquiera de los solventes o sistemas de solventes puede incluir uno o más estabilizadores, tales como un antioxidante, una sal (por ejemplo, cloruro de sodio), ácido cítrico, ácido ascórbico, glicina, cisteína, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), manitol, lactosa, trehalosa, maltosa, glicerol y/o glucosa. En ejemplos adicionales, el uno o más agentes de unión a ARN se introducen en una suspensión de lípidos usando un primer solvente o sistema de solventes y luego se agrega uno o más lípidos de transfección en un segundo solvente o sistema de solventes, donde el primer y segundo solventes o los sistemas de disolventes son iguales o diferentes (por ejemplo, el primer disolvente o sistema de disolventes es cualquiera descrito aquí, y el segundo disolvente o sistema de disolventes es cualquiera descrito aquí). En realizaciones particulares, el segundo disolvente o sistema de disolventes incluye uno o más disolventes acuosos o no acuosos seleccionados del grupo que consiste en solución salina, regulador (por ejemplo, citrato o PBS), agua y etanol. La suspensión final se puede separar opcionalmente (por ejemplo, mediante ultracentrifuga), mezclar (por ejemplo, mezclado por lotes, mezclado en línea y/o someter a vórtex), resuspender, ajustar (por ejemplo, con uno o más solventes o sistemas reguladores), sonicada, congelada-descongelada, extrudida y/o purificada.

Lípidos catiónicos

Se pueden incluir uno o más lípidos catiónicos en la formulación. Además de los compuestos de la invención, otros lípidos catiónicos incluyen, pero no se limitan a: cloruro de N,N-dioleil-N,N-dimetilamonio (DODAC), 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), N,N-diestearil-N,N-dimetilamonio (DDAB), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP, incluidas las formas quirales R-DOTAP y S-DOTAP), N-(1-(2,3-dioleiloil)propil)-N-2-(esperminacarboxamido)etil)-N,N-dimetilamonio (DOSPA), dioctadecilamidoglicilcarboxiespermina (DOGS), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP), N,N-dimetil-(2,3-dioleiloil)propilamina (DODMA), N-(1,2-dimiristiloxiprop-3-il)-N,N-dimetil-N-hidroxiethylamonio (DMRIE), 1,2-dilinoileiloxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinolenoxi-3-dimetilaminopropano (DLinDMA), 1,2-dilinoileoil-3-dimetilaminopropano (DLinDAP), 11-linoleoil-2-linoleiloil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 1,2-dilinoileilcarbamiloiloxi-3-dimetilaminopropano (DLin-C-DAP), 1,2-dilinoileil-3-dimetilaminopropano (DLin-S-DMA), 2,2-dilinoileil-4-dimetilaminometil-[1,3]-dioxolano (DLin-K-DMA), 2,2-dilinoileil-4-(2-dimetilaminoetil)-[1,3]-dioxolano (DLin-KC2-DMA), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-O-etil-3-fosfocolina (DPePC), cloruro de diestearildimetilamonio (DSDMA), 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (12:0 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro del mismo), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (16:0 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro del mismo), 1,2-distearoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:0 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro del mismo), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-etilfosfocolina (18:1 EPC, por ejemplo, o una sal de cloruro del mismo), dipalmitoil fosfatidiletanolamidoespermina (DPPEs), dipalmitoil fosfatidil etanolamido L-lisina (DPPEL), cloruro de 1-[2-dioleiloil)etil]-2-oleil-3-(2-hidroxyetil)imidazolinio (DOTIM), (1-metil-4-(cis-9-dioleil)metil-piridinio-cloruro) (SAINT), y C₁₂₋₂₀O, como se describe en Love et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 107(5):1864-1869 (2010).

Los lípidos catiónicos incluyen aquellos de diferentes formas quirales (por ejemplo, formas R o S de cualquier lípido catiónico descrito aquí) o cualquier forma de sal (por ejemplo, una sal de cloruro, bromuro, trifluoroacetato o metanosulfonato de cualquier lípido catiónico descrito aquí).

- Adicionalmente, se puede incluir un número de preparaciones comerciales de lípidos catiónicos en la formulación. Tales preparaciones comerciales incluyen, pero no se limitan a: Lipofectamine™ (una combinación de DOSPA y DOPE) y Lipofectin® (una combinación de DOTMA y DOPE) de Invitrogen Corp.; y Transfectam® (una composición que incluye DOGS) y Transfast™ de Promega Corp.

Lípidos aniónicos

- Se pueden incluir uno o más lípidos aniónicos en la formulación. Tales lípidos aniónicos incluyen, pero no se limitan a: fosfatidilgliceroles (PG), cardiolipinas (CLs), diacilfosfatidilserinas (PSs), ácidos diacilfosfatídicos (PAs), fosfatidilinositoles (PIs), N-acilfosfatidiletanolaminas, (NAPEs), N-succinilfosfatidiletanolaminas, N-glutarilfosfatidiletanolaminas, lisilfosfatidilgliceroles, y palmitoiloleoilfosfatidilgliceroles (POPG), así como diferentes formas quirales (por ejemplo, formas R o S), formas de sal (por ejemplo, unas sales de cloruro, bromuro, trifluoroacetato o de metanosulfonato) y mezclas de los mismos.

Lípidos neutros

- Se pueden incluir uno o más lípidos neutros en la formulación. Tales lípidos neutros incluyen, pero no se limitan a: ceramidas, esfingomiélna (SM), diacilgliceroles (DAGs), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC, incluidas las formas quirales R-DSPC y S-DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-dioleoil-glicero-sn-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dilaidoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DEPE), 1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (SOPE), 1,2-dilinoiloleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), así como diferentes formas quirales (por ejemplo, formas R o S), formas de sal (por ejemplo, sales de cloruro, bromuro, trifluoroacetato o de metanosulfonato) y mezclas de los mismos. Otros lípidos de diacil-sn-glicero-3-fosfocolina y diacil-glicero-sn-3-fosfoetanolamina también pueden usarse en las partículas lipídicas de la invención.

- En algunas realizaciones, el componente lipídico neutro presente en la formulación comprende uno o más fosfolípidos. En realizaciones adicionales, el componente lipídico neutro comprende una mezcla de uno o más fosfolípidos y colesterol. En algunas realizaciones, la selección de lípidos neutros para usar en la formulación se guía por la consideración de las propiedades farmacocinéticas y/o farmacodinámicas, por ejemplo, el tamaño de partícula lipídica y la estabilidad en el torrente sanguíneo.

Derivados de esteroides

- Se pueden incluir uno o más derivados de esteroides en la formulación. Sin desear estar limitado por la teoría, los derivados de esteroides pueden usarse para estabilizar la formulación y/o aumentar la transfección. Los derivados de esteroides de ejemplo incluyen colesterol, derivados de colestanol (por ejemplo, colestano, colesteno o coprostanol); 3β -[-(N,N',N'-dimetilaminoetano)-carbamoil]colesterol (DC-colesterol, por ejemplo, una sal de hidrocloreto del mismo); bis-guanidinium-tren-colesterol (BGTC); (2S,3S)-2-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)carbonilamino)etil 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato (DPC-1); (2S,3S)-((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il) 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato (DPC-2); bis((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il) 2,3,4-trihidroxipentanoato (DPC-3); y 6-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi)oxido)fosforiloxi)-2,3,4,5-tetrahidroxihexanoato (DPC-4).

Conjugados de PEG-lípidos

Se pueden incluir uno o más conjugados de PEG-lípidos en la formulación. Sin desear estar limitado por la teoría, los conjugados de PEG-lípidos podrían reducir la agregación de los vectores de lípidos. Los conjugados de PEG-lípidos se describen en la Patente U.S. No. 5,885,613 y la Publicación de Patente U.S. N° 2003/0077829.

- Los conjugados de PEG-lípidos que pueden incluirse en la formulación incluyen, pero no se limitan a: 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DMPE) (por ejemplo, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-poli-etilenglicol-2000) (PEG-2000-DMPE)), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DPPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DSPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DOPE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-(metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DMG) (por ejemplo, 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-(metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-2000-DMG)), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-(metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DPG), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-(metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DSG), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-(metoxi-poli-etilenglicol) (PEG-DOG), 3-N-[(ω -metoxipoli(etilenglicol)2000) carbamoil]-1,2-dimiristiloxi-propilamina (PEG-C-

DMA), R-3-[(ω -metoxi poli (etilenglicol) 2000) carbamoil]] - 1,2-dimiristiloxlpropil-3-amina (PEG-2000-C-DOMG) y conjugados de PEG-ceramida (por ejemplo, PEG-CerC14 o PEG-CerC20, los cuales se describen en la patente U.S. No. 5,820,873. Los conjugados adicionales de PEG-lípido incluyen conjugado de PEG con cualquier lípido descrito aquí, tal como fosfatidiletanolamina o ceramida (véanse las patentes U.S. Nos. 5,820,873; 5,534,499; y 5,885,613, o sales de trimetilamonio).

El conjugado PEG-lípido puede incluir una o más modificaciones diversas, tales como sustituciones con cualquier molécula lipídica descrita en el presente documento o con unidades estructurales PEG de diferentes pesos moleculares (por ejemplo, de 300 a 5,000 daltons). Las sustituciones de ejemplo incluyen el uso de uno o más de C14: 0 (como en la Tabla 4), C16 (PEG-DPPE, PEG-DPG, etc.), C18:0 (PEG-DSPE, PEG-DSG, etc.), o C18: 1 (PEG-DOPE, PEG-DOG, etc.) en combinación con una unidad estructural de polietilenglicol (por ejemplo, PEG2000, PEG3400, PEG5000, etc.) para formar un conjugado de PEG-lípido (por ejemplo, MPEG2000-DMG). Los ejemplos de unidades estructurales de PEG con diversos pesos moleculares incluyen PEG350, PEG550, PEG750, PEG1000, PEG2000, PEG3000, PEG3400, PEG4000 y PEG5000.

Otros componentes

La formulación puede incluir cualquier otro componente para ayudar a estabilizar el vector lipídico, reducir la agregación de vectores lipídicos y/o administrar un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de iARN). Los componentes de ejemplo incluyen conjugados de poliamida-lípidos (ATTA-lípidos) basados en monómeros de ácido ω -amino (oligoetilenglicol)alcanoico, tales como los descritos en las patentes U.S. Nos. 6,320,017 y 6,586,559; gangliósidos (por ejemplo, asialogangliósido GM1 o GM2; disialogangliósido GD1a, GD1a-NAcGal, GD1-b, GD2 o GD3; globosido, monosialogangliósido GM1, GM2 o GM3, tetrasialogangliósido GQ1b, y trisialogangliósido GT1a o GT1b); antioxidantes (por ejemplo, α -tocoferol o β -hidroxitoluidina); uno o más surfactantes (por ejemplo, monopalmitato de sorbitán o monopalmitato de sorbitán, ésteres oleosos de sacarosa, ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitano, ésteres de ácido graso de polioxietilen sorbitol, ésteres de ácido graso de polioxietileno, ésteres de polioxietileno alquilo, polímeros de bloque y cetil éter, así como aceite de ricino de polioxietileno o derivados de aceite de ricino hidrogenados y ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, tales como Pluronic®, Poloxamer®, Span®, Tween®, Polysorbate®, Tyloxapol®, Emulphor® o Cremophor® (por ejemplo, Cremophor® EL que tiene un componente principal de ricinoleato de glicerol-polietilenglicol con ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol); uno o más agentes anfifílicos (por ejemplo, aceites vegetales, tales como aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de sésamo, aceite de borraja, aceite de ricino y aceite de semilla de algodón; aceites minerales y aceites marinos, triglicéridos hidrogenados y/o fraccionados de tales fuentes; triglicéridos de cadena media (MCT-aceites, por ejemplo, Miglyol®), y diversos mono-, di- o triglicéridos sintéticos o semisintéticos, tales como los lípidos no polares definidos descritos en el documento WO 92/05571, así como monoglicéridos acetilados o ésteres alquílicos de ácidos grasos, tales como miristato de isopropilo, oleato de etilo (véase el documento EP 0 353 267) o alcoholes de ácidos grasos, tales como alcohol oleílico, alcohol cetílico); y una o más sales, tales como cualquier sal descrita aquí. Típicamente, la concentración del componente lipídico seleccionado para reducir la agregación es de aproximadamente 1% en moles a 15% en moles.

Vectores de lípidos

La formulación de la invención puede incluir uno o más compuestos de la invención (por ejemplo, un compuesto seleccionado de la Tabla 1) y cualquier composición basada en lípidos capaz de transportar un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de iARN). Composiciones basadas en lípidos de ejemplo incluyen una o más moléculas de lípidos (por ejemplo, compuestos de la invención, lípidos catiónicos, lípidos aniónicos o lípidos neutros) y/o uno o más componentes (por ejemplo, derivados de esteroides y/o conjugados de PEG-lípidos).

Los vectores lipídicos pueden formarse usando cualquier lípido biocompatible o combinación de lípidos capaces de formar un vector lipídico (por ejemplo, liposomas, lipoplex y micelas). La encapsulación de un agente terapéutico en un vector lipídico puede proteger al agente del daño o la degradación o facilitar su entrada en una célula. Los vectores lipídicos, como resultado de las interacciones de carga (por ejemplo, un vector lipídico catiónico y una membrana celular aniónica), interactúan y se fusionan con la membrana celular, liberando así el agente en el citoplasma. Un liposoma es una vesícula bicapa que comprende uno o más de los compuestos de la invención, moléculas de lípidos y/o componentes. Una nanopartícula lipídica es un liposoma que varía en tamaño de aproximadamente 1 nm a aproximadamente 1,000 nm. Un lipoplex es un liposoma formado con moléculas de lípidos catiónicos para impartir una carga positiva general al liposoma. Una micela es una vesícula con una sola capa de moléculas de lípidos.

Liposomas

En ciertas realizaciones, el vector lipídico es un liposoma. Típicamente, los lípidos utilizados son capaces de formar una bicapa y son catiónicos. Las clases de moléculas lipídicas adecuadas incluyen fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidilcolina), ácidos grasos, glicolípidos, ceramidas, glicéridos y colesterolos, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente o además, el vector lipídico puede incluir lípidos neutros (por ejemplo, dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE)). Otros lípidos que pueden formar vectores lipídicos son conocidos en la técnica y se describen en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, una "molécula lipídica" es una molécula con una unidad estructural de cabeza hidrófoba y una unidad estructural de cola hidrófila y puede ser capaz de formar liposomas, incluido un compuesto de la invención o cualquier lípido catiónico, neutro o aniónico descrito aquí. La molécula lipídica puede modificarse opcionalmente para incluir grupos poliméricos hidrófilos. Ejemplos de tales moléculas lipídicas incluyen 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000] (PEG2000-DSPE), por ejemplo, una sal de amonio del mismo) y 1,2-diestearoil -sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi(polietilenglicol)-2000] (carboxi PEG2000-DSPE).

Ejemplos de moléculas de lípidos incluyen lípidos naturales, tales como cardiolipina (CL), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidilcolina (LPC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilinositol (PS) y fosfato de sodio (PI) y fosfatidil serina (PS); mezclas de lípidos, tales como lecitina; esfingolípidos, tales como esfingosina, ceramida, esfingomielina, cerebrósidos, sulfatidas, gangliósidos y fitosfingosina; lípidos catiónicos, tales como 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio-propano (DODAP), bromuro de N-[1-(2,3,-ditetradeciloxi) propil]-N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio (DMRIE), bromuro de N-[1-(2,3, -dioleiloxi)propil] -N,N-dimetil-N-hidroxi-etilamonio (DORIE) y 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA); fosfatidilcolinas, tales como 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-etilfosfocolina, 1,2-dilauroil-sn-glicero-3-fosfocolina (DLPC), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DMPC), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC) y 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC); fosfoetanolaminas, tales como 1,2-dibutiril-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DSPE), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPE), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (POPE) y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(glutarilo); ácidos fosfatídicos, tales como dicetil fosfato (DCP), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfato, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfato y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfato; fosfatidilgliceroles, tales como dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), dioleoil fosfatidilglicerol (DOPG), 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) y 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfo-(1'-rac-glicerol); fosfatidilserinas, tales como 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina, 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina y 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfo-L-serina; cardiolipinas, tales como 1',3'-bis [1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfo]-sn-glicerol, y conjugados de PEG-lípidos, tales como 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-750], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol)-2000], 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N- [metoxi (polietilenglicol)-5000], 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] y 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi (polietilenglicol)-2000].

Los compuestos de la invención se pueden combinar con cualquier composición lipídica útil, incluidas las composiciones lipídicas disponibles comercialmente. Ejemplos de tales composiciones incluyen Lipofectamine™ (una combinación de DOSPA y DOPE) y Lipofectin® (una combinación de DOTMA y DOPE) de Invitrogen Corp.; Transfectam® (una composición que incluye DOGS) y Transfast™ de Promega Corp.; NeuroPORTER™ y Escort™ de Sigma-Aldrich Co.; FuGENE® 6 de Roche; y LipoTAXI® de Strategene. Las composiciones lipídicas conocidas incluyen la tecnología Lipsome del caballo de Troya, como se describe en Boado, Pharm. Res. 24: 1772-1787 (2007).

Los liposomas también pueden incluir otros componentes que ayudan en la formación o estabilidad de los liposomas. Ejemplos de componentes incluyen colesterol, antioxidantes (por ejemplo, α -tocoferol o β -hidroxitoluidina), surfactantes y sales.

El liposoma puede ser de cualquier combinación útil que comprenda moléculas de lípidos, incluidos uno o más compuestos de la invención y otros componentes de lípidos que ayudan en la formación o estabilidad de los liposomas. Un experto en la técnica sabrá cómo optimizar la combinación que favorece la encapsulación de un agente particular, la estabilidad del liposoma, las condiciones de reacción aumentadas o cualquier otro factor pertinente. Se describen combinaciones de ejemplo en Boado, Pharm. Res. 24: 1772-1787 (2007).

La producción de liposomas típicamente ocurre a través de un proceso general de dos etapas. En la primer etapa, los lípidos y los componentes lipídicos se mezclan en un solvente orgánico volátil o mezclas de solventes para asegurar una mezcla homogénea de lípidos. Ejemplos de solventes incluyen cloroformo, metanol, ciclohexano y t-butanol. Luego se elimina el disolvente para formar una mezcla de lípidos secos en una película, polvo o pella. El disolvente también se puede eliminar mediante el uso de cualquier técnica analítica conocida, tal como el uso de nitrógeno, evaporación rotativa, secado por aspersion, liofilización y secado al vacío.

En la segunda etapas, la mezcla de lípidos secos se hidrata con una solución acuosa para formar liposomas. El agente se puede agregar a la solución acuosa, lo que da como resultado la formación de liposomas con agente encapsulado. Alternativamente, los liposomas se forman primero con una primera solución acuosa y luego se exponen a otra solución acuosa que contiene el agente. La encapsulación del agente puede promoverse mediante cualquier técnica conocida, tal como repetir ciclos de congelación-descongelación, sonicación o mezcla. Otro ejemplo de esta metodología se describe en Boado, Pharm. Res. 24: 1772-1787 (2007). Alternativamente, el agente se acopla a una unidad estructural hidrófoba (por ejemplo, colesterol) para producir un derivado lipofílico y el derivado lipofílico se usa con otras moléculas de lípidos a partir de liposomas.

Durante la segunda etapa, la mezcla de lípidos secos puede o no contener el conjugado polipéptido-lípido. El proceso puede incluir opcionalmente diversas etapas adicionales, que incluyen calentar la solución acuosa más allá de la

temperatura de transición de fase de las moléculas de lípidos antes de agregarla a la mezcla de lípidos secos, donde los rangos particulares de temperaturas incluyen de aproximadamente 40 °C a aproximadamente 70 °C; incubar la combinación de la mezcla de lípidos secos y la solución acuosa, donde los rangos de tiempo particulares incluyen de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas; mezclar la mezcla de lípidos secos y la solución acuosa durante la incubación, tal como mezclando, batiendo, revolviendo o agitando en vórtex; adición de no electrolitos a la solución acuosa para asegurar la osmolalidad fisiológica, tal como una solución de solución salina al 0.9%, dextrosa al 5% y sacarosa al 10%; alteración de grandes vesículas multilamelares, tales como por extrusión o sonicación; e incubación adicional de los liposomas preformados con conjugado polipéptido-lípido, donde la mezcla de lípidos secos no contenía las moléculas de lípidos. Un experto en la técnica podrá identificar la temperatura particular y los tiempos de incubación durante esta etapa de hidratación para garantizar la incorporación de la molécula lipídica derivada en los liposomas o para obtener liposomas estables.

Los compuestos de la invención se pueden agregar en cualquier punto del proceso de formación de liposomas. En un ejemplo, el compuesto se agrega a los lípidos y componentes de lípidos durante la formación de la mezcla de lípidos secos. En otro ejemplo, el compuesto se agrega a los liposomas que se forman previamente con una mezcla de lípidos secos que contiene los lípidos y los componentes lipídicos. En aún otro ejemplo, las micelas se forman con el compuesto, los liposomas se forman con una mezcla de lípidos secos que contiene lípidos y componentes lipídicos, y luego las micelas y los liposomas se incuban juntos. La solución acuosa puede incluir componentes adicionales para estabilizar el agente o el liposoma, tales como reguladores, sales, agentes quelantes, solución salina, dextrosa, sacarosa, etc.

En un ejemplo de este procedimiento, una película seca compuesta de la mezcla de lípidos se hidrata con una solución acuosa que contiene un agente. Esta mezcla se calienta primero hasta 50 °C durante 30 minutos y luego se enfría hasta temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se transfiere a una película seca que contiene el conjugado polipéptido-lípido. La mezcla se incuba a 37 °C durante dos horas para incorporar el conjugado polipéptido-lípido en los liposomas que contienen el agente. Véase, por ejemplo, Zhang et al., J. Control. Lanzamiento 112: 229-239 (2006).

Partículas lipídicas que tienen estructura vesicular.

En ciertas realizaciones, la partícula lipídica comprende un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA y/o un lípido de amino-amina, lípido de amino-amida u otro lípido de la invención) y un agente de iARN, así como un lípido neutro o zwitteriónico, un conjugado de PEG-lípido y, opcionalmente, colesterol.

Partículas lipídicas que tienen uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección

Las partículas lipídicas también incluyen aquellas que tienen uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección. En una realización, el uno o más agentes de unión a ARN forman un agregado interno, y el uno o más lípidos de transfección forman una superficie agregada externa. En realizaciones particulares, la superficie agregada externa no es una membrana, una bicapa lipídica y/o una capa multilamelar. En ciertas realizaciones, el uno o más agentes de unión a ARN (por ejemplo, lípidos) representan aproximadamente 10-90% de los lípidos totales. En otras realizaciones, el uno o más agentes de unión a ARN (por ejemplo, lípidos) representan aproximadamente el 50% del lípido total. En otras realizaciones, el uno o más agentes de unión a ARN (por ejemplo, lípidos) representan aproximadamente el 30% del lípido total. En ciertas realizaciones, el complejo/agregado de una carga útil de ácidos nucleicos con el uno o más agentes de unión a ARN de la partícula lipídica comprende un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, y/o un lípido de amino-amina o amino-amida de la invención) y un agente de iARN; y el uno o más lípidos de transfección de la partícula lipídica comprenden un lípido neutro o zwitteriónico, un conjugado de PEG-lípido y, opcionalmente, colesterol. En otras realizaciones, el uno o más lípidos de transfección de la partícula comprenden un lípido catiónico (por ejemplo, DODMA, DOTMA, un lípido de amino-amina y/o un lípido de amino-amida), un lípido neutro, un conjugado de PEG-lípido, y, opcionalmente, colesterol.

Agentes de iARN

La interferencia de ARN (iARN) es un mecanismo que inhibe la expresión génica al causar la degradación de moléculas de ARN específicas u obstaculizar la transcripción de genes específicos. En la naturaleza, las dianas de iARN suelen ser moléculas de ARN de virus y transposones (una forma de respuesta inmune innata), aunque también desempeña un papel en la regulación del desarrollo y el mantenimiento del genoma. La clave del mecanismo de iARN son las cadenas de ARN de interferencia pequeña (ARNip), que tienen secuencias de nucleótidos suficientemente complementarias a una molécula de ARN mensajero (ARNm) dirigido. El ARNip dirige las proteínas dentro de la ruta de iARN al ARNm objetivo y las degrada, descomponiéndolas en porciones más pequeñas que ya no pueden traducirse en proteínas.

La ruta de iARN es iniciada por la enzima Dicer, que escinde moléculas largas de ARN bicatenario (ARNbc) en moléculas de ARNip, típicamente de aproximadamente 21 a aproximadamente 23 nucleótidos de longitud y que contiene aproximadamente 19 pares de dúplex. Una de las dos cadenas de cada fragmento, conocida como la cadena guía, se incorpora luego al complejo silenciador inducido por ARN (RISC) y se combina con secuencias complementarias. RISC media la escisión del ARN monocatenario que tiene una secuencia complementaria a la cadena antisentido del dúplex ARNip. La escisión del ARN diana tiene lugar en el medio de la región complementaria

a la cadena antisentido del dúplex ARNip. El resultado de este evento de reconocimiento es el silenciamiento génico postranscripcional. Esto ocurre cuando la cadena guía se empareja específicamente con una molécula de ARNm e induce la degradación por Argonaute, el componente catalítico del complejo RISC.

5 Los compuestos de la invención se pueden usar para administrar uno o más agentes de iARN a una célula in vitro o in vivo (por ejemplo, en un sujeto). Los agentes de iARN pueden incluir diferentes tipos de moléculas de doble cadena que incluyen bien sea cadenas de ARN:ARN o ARN:ADN. Estos agentes pueden introducirse en las células en una variedad de estructuras, que incluyen un dúplex (por ejemplo, con o sin colgantes en el terminal 3'), un bucle de horquilla o un vector de expresión que expresa uno o más polinucleótidos capaces de formar un polinucleótido de doble cadena solo o en combinación con otro polinucleótido. Los agentes de iARN de ejemplo incluyen ARNip, 10 ARNHC, ARNsiD y miRNA, que se describen en el presente documento. Generalmente, estos agentes tienen una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, y las longitudes preferidas se describen a continuación para agentes de iARN particulares.

15 El silenciamiento génico funcional por un agente de iARN no incluye necesariamente la inhibición completa del producto génico objetivo. En algunos casos, las disminuciones marginales en la expresión del producto génico causadas por un agente de iARN pueden traducirse en cambios funcionales o fenotípicos significativos en la célula, tejido, órgano o animal huésped. Por lo tanto, se entiende que el silenciamiento génico es un equivalente funcional y el grado de degradación del producto génico para lograr el silenciamiento puede diferir entre los objetivos génicos o el tipo de célula huésped.

ARNip

20 El ARN interferente pequeño (ARNip) generalmente son moléculas de ARN bicatenario de 16 a 30 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 18 a 25 nucleótidos, por ejemplo, 21 nucleótidos) con uno o dos colgantes de nucleótidos en el terminal 3' o sin ningún colgante. Un profesional experto puede variar esta longitud de secuencia (por ejemplo, para aumentar o disminuir el nivel general de silenciamiento génico). En ciertas realizaciones, los colgantes son UU o dTdT en el terminal 3'. En general, las moléculas de ARNip son completamente complementarias a una cadena de una 25 molécula de ADN diana, ya que incluso la no coincidencia de un solo par de bases han demostrado reducir el silenciamiento. En otras realizaciones, los ARNip pueden tener una composición de esqueleto modificada, tal como, por ejemplo, modificaciones 2'-desoxi o 2'-O-metilo, o cualquier modificación descrita aquí.

30 ARNip se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de inhibir o subregular la expresión génica de una manera específica de secuencia; véase, por ejemplo, Zamore et al., Cell 101:25-33 (2000); Bass, Nature 411:428-429 (2001); Elbashir et al., Nature 411:494-498 (2001); y las publicaciones PCT Nos. WO 00/44895, WO 01/36646, WO 99/32619, WO 00/01846, WO 01/29058, WO 99/07409, y WO 00/44914. Los métodos para preparar una molécula de ARNip para uso en el silenciamiento génico se describen en la Patente U.S. No. 7,078,196, que se incorpora aquí como referencia.

ARNhc

35 El ARN de horquilla corto (ARNhc) son moléculas de ARN monocatenario en las que está presente una estructura de bucle de horquilla, lo que permite que los nucleótidos complementarios dentro de la misma cadena formen enlaces intermoleculares. El ARNhc puede exhibir una sensibilidad reducida a la degradación de la nucleasa en comparación con el ARNip. En ciertas realizaciones, un ARNhc tiene una longitud de tallo de 19 a 29 nucleótidos de longitud (por ejemplo, 19 a 21 nucleótidos o 25 a 29 nucleótidos). En algunas realizaciones, el tamaño del bucle es de entre 4 y 23 40 nucleótidos de longitud. El ARNhc generalmente puede contener uno o más no coincidencias, por ejemplo, no coincidencias G-U entre las dos cadenas del tallo del ARNhc, sin disminuir la potencia.

ARNsiD

45 El ARN en sustrato Dicer (ARNsiD) son agentes de ARN bicatenarios de 25 a 35 nucleótidos. Se cree que los agentes de tal longitud son procesados por la enzima Dicer de la ruta de interferencia de ARN (iARN), mientras que los agentes de menos de 25 nucleótidos generalmente imitan los productos Dicer y escapan del procesamiento de Dicer. En algunas realizaciones, el ARNsiD tiene un colgante de nucleótido monocatenario en el terminal 3' de la cadena antisentido o en sentido de 1 a 4 nucleótidos (por ejemplo, 1 o 2 nucleótidos).

50 Ciertas estructuras modificadas de los agentes de ARNsiD se describieron previamente, tal como en la publicación de patente U.S. Número 2007/0265220. Las estructuras de ARNsiD adicionales y las composiciones específicas adecuadas para uso en las formulaciones de la presente invención se describen en la Solicitud de Patente U.S. Núm. 12/586.283; Publicaciones de patentes U.S. Nos. 2005/0244858, 2005/0277610, 2007/0265220, 2011/0021604, 2010/0173974, 2010/0184841, 2010/0249214, 2010/0331389, 2011/0003881, 2011/0059187, 2011/0111056; y las publicaciones PCT Nos. WO 2010/080129, WO 2010/093788, WO 2010/115202, WO 2010/115206, WO 2010/141718, WO 2010/141724, WO 2010/141933, WO 2011/072292, WO 2011/075188. En general, los constructos de ARNsiD se 55 sintetizan utilizando métodos de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida como se describe para ARNip de 19-23mer (véanse las patentes U.S. Nos. 5,804,683; 5,831,071; 5,998,203; 6,117,657; 6,353,098; 6,362,323; 6,437,117; 6,469,158; 6,111,086; 6,008,400; y 6,111,086)).

miARN

Los microARN (miARN) son moléculas de ARN monocatenarias de 17 a 25 nucleótidos (por ejemplo, 21 a 23 nucleótidos) de longitud. Un profesional experto puede variar esta longitud de secuencia para aumentar o disminuir el nivel general de silenciamiento génico. Estos agentes silencian un gen diana mediante la unión de secuencias complementarias en el ARN mensajero diana. Como se usa en el presente documento, el término "precursor de miARN" se usa para abarcar, sin limitación, transcripciones de ARN primarias, pri-miARN y pre-miARN. Una "carga útil de miRNA" de la invención puede incluir pri-miARN, pre-miARN y/o miARN (o miARN maduro). En ciertas realizaciones, un ARNip (por ejemplo, Un ARNsiD) de la invención puede presentar una cadena guía que incorpora una secuencia de miARN, o es suficientemente homóloga a la secuencia de miARN para funcionar como dicho miARN (convirtiendo dicho ARNip en un "miARN mimético").

Compuestos antisentido

Los compuestos antisentido de ejemplo comprenden un rango de longitud de nucleósidos consecutivos, en el que el extremo superior del rango es de 50 nucleósidos y en el que el extremo inferior del rango es de 8 nucleósidos. En ciertas realizaciones, el extremo superior del rango es de 35 nucleósidos y el extremo inferior del rango es de 14 nucleósidos. En realizaciones adicionales, el extremo superior del rango es de 24 nucleósidos y el extremo inferior del rango es de 17 nucleósidos. En otras realizaciones adicionales, el compuesto antisentido tiene 20 nucleósidos consecutivos. Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente que el extremo superior del rango, como se divulga en el presente documento, comprende 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 nucleósidos consecutivos y el extremo inferior del rango comprende 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 nucleósidos consecutivos.

Los compuestos antisentido de ejemplo comprenden un tramo de al menos 8, opcionalmente al menos 12, opcionalmente al menos 15 nucleósidos consecutivos que es suficientemente complementario a una secuencia diana para interferir con la transcripción, traducción, promover la degradación (opcionalmente degradación mediada por nucleasas) y/o de otro modo interrumpir la función (por ejemplo, interferir con la función de una secuencia objetivo de otro modo funcional, por ejemplo, la interrupción de un promotor, potenciador u otra secuencia objetivo de ácido nucleico funcional mediante un mecanismo mediado por compuestos antisentido) de la secuencia diana.

Se pueden hacer modificaciones a los compuestos antisentido y pueden incluir grupos conjugados unidos a uno de los terminales, posiciones de nucleobase seleccionadas, posiciones de azúcar o a uno de los enlaces internucleosídicos. Las posibles modificaciones incluyen, pero no se limitan a, 2'-fluro (2'-F), 2'-OMetilo (2'-OMe), 2'-O-(2-metoxietil) (2'-MOE) modificaciones de azúcares de alta afinidad, tapas abásicas invertidas, desoxinucleobases y análogos de nucleobases bicíclicos, tales como los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y los ácidos nucleicos con puentes de etileno (ENA).

Método de fabricar agentes de iARN

Los agentes de iARN incluyen al menos una secuencia de nucleótidos antisentido que se dirige a un ácido nucleico diana (por ejemplo, un gen diana). Los nucleótidos antisentido son cadenas simples de ADN o ARN que son complementarias de una secuencia diana elegida. En el caso del ARN antisentido, evitan la traducción de cadenas de ARN complementarias al unirse a él. El ADN antisentido puede usarse para apuntar a un ARN específico complementario (codificante o no codificante). En una realización particular, los nucleótidos antisentido contienen de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 nucleótidos. El nucleótido antisentido puede tener hasta 80%, 85%, 90%, 95%, 99% o incluso 100% complementario al gen diana deseado.

Los métodos para producir nucleótidos antisentido y en sentido, así como los dúplex correspondientes o bucles de horquilla, son conocidos en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para producir un oligonucleótido antisentido que se dirige a cualquier secuencia de ácidos nucleicos diana. Las secuencias de nucleótidos antisentido pueden seleccionarse para optimizar la especificidad del objetivo, tal como analizando la secuencia diana y determinando la estructura secundaria, la T_m, la energía de unión y la estabilidad relativa; y/o para reducir la formación de estructuras secundarias, tales como dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían o prohibirían la unión específica al ARNm diana en una célula huésped. En algunas realizaciones, las regiones objetivo altamente preferidas del ARNm incluyen aquellas regiones en o cerca del codón de iniciación de la traducción AUG y aquellas secuencias que son sustancialmente complementarias a las regiones 5' del ARNm. Estos análisis de la estructura secundaria y las consideraciones de selección del sitio objetivo se pueden realizar, por ejemplo, usando v.4 del software de análisis de cebadores OLIGO (Molecular Biology Insights) y/o el software del algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul et al., Nucleic Acids Res 25 (17): 3389-3402, 1997). Los métodos no limitantes para preparar agentes de iARN se describen en las Patentes U.S. Nos. 5,804,683; 5,831,071; 5,998,203; 6,117,657; 6,353,098; 6,362,323; 6,437,117; 6,469,158; 6,111,086; 6,008,400; y 6,111,086.

Los agentes de iARN pueden tener cualquier forma útil, tal como monocatenaria, bicatenaria, lineal, circular (por ejemplo, un plásmido), circular mellada, enrollada, superenrollada, concatemerizada o cargada. Adicionalmente, los

nucleótidos pueden contener modificaciones terminales en sentido y antisentido de 5' y 3' y pueden tener nucleótidos terminales romos o colgantes (por ejemplo, UU o TT en el terminal 3'), o combinaciones de los mismos.

Los ácidos nucleicos modificados, incluidas las moléculas de ADN o ARN modificadas, pueden usarse en lugar de los ácidos nucleicos de origen natural en los polinucleótidos (por ejemplo, agentes de iARN) descritos aquí. Los ácidos nucleicos modificados pueden mejorar la vida media, la estabilidad, la especificidad, la administración, la solubilidad y la resistencia a las nucleasas de los polinucleótidos descritos aquí. Por ejemplo, los agentes de ARNip pueden estar compuestos parcial o completamente por análogos de nucleótidos que confieren las cualidades beneficiosas descritas anteriormente. Como se describe en Elmén et al. (Nucleic Acids Res. 33: 439-447 (2005)), se pueden usar análogos de nucleótidos sintéticos similares a ARN (por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA)) para construir moléculas de ARNip que exhiban actividad de silenciamiento contra un producto génico diana.

La modificación del esqueleto de fosforotioato (PS), donde un oxígeno no puente en el enlace fosfodiéster es reemplazado por azufre, es uno de los primeros y más comunes medios desplegados para estabilizar los fármacos de ácidos nucleicos contra la degradación de la nucleasa. En general, parece que las modificaciones de PS se pueden realizar ampliamente en ambas cadenas de ARNip sin mucho impacto en la actividad (Kurreck, Eur. J. Biochem. 270: 1628-44 (2003)). En realizaciones particulares, la modificación de PS está usualmente restringida a una o dos bases en los extremos 3' y 5'. El enlazador de boranofosfato se puede usar para potenciar la actividad de ARNip mientras que tiene baja toxicidad (Hall et al., Nucleic Acids Res. 32: 5991-6000 (2004)). Otras modificaciones de ejemplo del esqueleto de oligonucleótidos incluyen metilfosfonatos, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, alquilfosfonatos (por ejemplo, 3'-alquilenfosfonato), fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos (por ejemplo, 3'-aminofosforamidato), aminoalquilfosforamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres, y un esqueleto de nucleótido de proteína (PNA) que tiene unidades de N-(2-aminoetil)-glicina de repetición enlazados por uniones peptídicas, donde los compuestos representativos de PNA incluyen, pero no se limitan a, aquellos divulgados en la patente U.S. Nos. 5,539,082, 5,714,331, Y 5,719,262, y Nielsen et al., Science 254: 1497-1500 (1991).

Otras modificaciones al esqueleto incluyen aquellas que reemplazan el átomo de fósforo con enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo de cadena corta, heteroátomo mixto y enlaces internucleosídicos de alquilo o cicloalquilo, o uno o más enlaces internucleosídicos heteroatómicos o heterocíclicos de cadena corta (por ejemplo, enlaces morfolino; esqueletos de siloxano; sulfuro, esqueletos de sulfóxido y sulfona; esqueletos de formacetilo y tioformacetilo; esqueletos de metilen formacetilo y tioformacetilo; esqueletos que contienen alqueno; esqueletos de sulfamato; esqueletos de metilnimino y metilhidrazino; esqueletos de sulfonato y sulfonamida; esqueletos de amida y otros que tienen partes componentes mixtos de N, O, S y CH₂).

Ciertas nucleobases modificadas son particularmente útiles para aumentar la afinidad de unión de los compuestos oligoméricos de la invención, tales como pirimidinas 5-sustituidas, 6-azapirimidinas y purinas N-2, N-6 y O-6 sustituidas (por ejemplo, 2-aminopropiladenina, 5-propiniluracilo, 5-propinilcitosina y 5-metilcitosina). Nucleobases modificadas de ejemplo incluyen 5-metilcitosina (5-me-C o m5c); 5-hidroximetil citosina, xantina e hipoxantina; 2-aminoadenina, 6-metilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; 2-propilo y otros derivados de alquilo de adenina y guanina; 2-tiouracilo; 2-tiotinamina; 2-tiocitosina; 5-halouracilo y citosina; 5-propinil uracilo y citosina; 6-azo uracilo, citosina y timina; 5-uracilo (pseudouracilo); 4-tiouracilo; 8-halo, 8-amino, 8-tiol, 8-tioalquilo, 8-hidroxi y otras adeninas y guaninas 8-sustituidas; 5-halo, particularmente 5-bromo, 5-trifluorometilo y otros uracilos y citosinas 5-sustituidos; 7-metilguanina; 7-metiladenina; 8-azaguanina; 8-azaadenina; 7-desazaquanina; 7-desazaadenina; 3-desazaquanina; y 3-desazaadenina. Estas nucleobases modificadas pueden combinarse, en realizaciones particulares, con otras modificaciones, tales como cualquier modificación de azúcar descrita aquí.

Los oligonucleótidos modificados también pueden contener uno o más unidades estructurales de azúcar sustituidas, donde se pueden hacer modificaciones en cualquier sitio reactivo del anillo de ribosa (por ejemplo, el 2'-OH del anillo de ribosa), o una o más bases universales. Las modificaciones de ejemplo incluyen 2'-halo, tales como F, Br o Cl; 2'-O-alquilo, 2'-S-alquilo o 2'-N-alquilo, tal como 2'-OMe; 2'-O-(alquil-O)ⁿ-alquilo, tal como 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE), 2'-O[(CH₂)_nO]_mCH₃, 2'-O(CH₂)_nOCH₃, 2'-O(CH₂)₂ON(CH₃)₂O(CH₂)_nNH₂, O(CH₂)_nCH₃, 2'-O(CH₂)_nONH₂, and 2'-O(CH₂)_nON[(CH₂)_nCH₃]₂, donde n y m son de 1 a aproximadamente 10; 2'-O-alqueno, 2'-S-alqueno o 2'-N-alqueno; 2'-O-alquinilo, 2'-S-alquinilo o 2'-N-alquinilo, en donde el alquilo, alqueno y alquinilo pueden ser alquilo C1-10 o alqueno y alquinilo C2-10 sustituidos o no sustituidos, así como una modificación de puente entre las posiciones 2' y 4' de ribosa para formar un ácido nucleico bloqueado (LNA). Las bases universales de ejemplo incluyen una unidad estructural heterocíclica ubicada en la posición 1' de una unidad estructural de azúcar nucleótido en un nucleótido modificado, o la posición equivalente en una sustitución de unidad estructural de azúcar nucleótido, tal como 1-β-D-ribofuranosil-5-nitroindol y 1-β-D-ribofuranosil-3-nitropirrol.

En ciertas realizaciones, se pueden emplear ácidos nucleicos que poseen formas de modificación y/o patrones de modificación descritos. Se pueden encontrar detalles adicionales con respecto a modificaciones de ejemplo y patrones de modificación de ácidos nucleicos, por ejemplo, en al menos las siguientes referencias: US 2010/0240734; WO 2010/080129; WO 2010/033225; US 2011/0021604; WO 2011/075188; WO2011/072292; WO 2010/141724; WO 2010/141726; WO 2010/141933; WO 2010/115202; WO 2008/136902; WO/2011/109294; WO/2011/075188; PCT/US11/42810; PCT/US11/42820; Número de serie U.S. 61/435.304; Número de serie U.S. 61/478,093; Número de serie U.S. 61/497,387; Número de serie U.S. 61/529.422; Pat. No. 7,893,245; WO 2007/051303; y US 2010/0184209.

Dianas del gen de iARN

La presente invención presenta el silenciamiento de un gen diana en un tejido u órgano enfermo mediante tratamiento con un compuesto o formulación, en combinación con un agente de iARN. El potencial terapéutico de la presente invención se realiza cuando las moléculas de ARNm de un gen específico y dirigido que se sabe o se piensa que están involucradas en el establecimiento o mantenimiento del estado de la enfermedad (por ejemplo, un cáncer) se degradan por el agente de iARN.

Ejemplos de objetivos de iARN para usar con la presente invención incluyen proteínas de desarrollo, tales como moléculas de adhesión, inhibidores de la ciclina quinasa, miembros de la familia Wnt, miembros de la familia Pax, miembros de la familia de la hélice Alada, miembros de la familia Hox, citocinas/linfocinas y sus receptores, factores de crecimiento/diferenciación y sus receptores, neurotransmisores y sus receptores; proteínas codificadas por oncogén (por ejemplo, ABL1 (entrada de UniProt No. P00519, ID del gen NCBI: 25), AR (entrada de UniProt No. P10275, ID del gen NCBI: 3647), β -Catenina (CTNNB1, UniProt Entrada No. P35222, ID del gen NCBI: 1499), BCL1 (UniProt Entrada No. P24385, ID del gen NCBI: 595), BCL2 (UniProt Entrada No. P10415, ID del gen NCBI: 596), BCL6 (UniProt Entrada No. P41182), CBFA2 (UniProt Entrada No. Q01196, ID del gen NCBI: 861), CBL (UniProt Entrada No. P22681, ID del gen NCBI: 687), CSF1R (UniProt Entrada No. P07333, ID del gen NCBI: 1436), ERBA1 (UniProt Entrada No. P10827, ID del gen NCBI: 7067), ERBA2 (UniProt Entrada No. P10828, ID del gen NCBI: 7068), ERBB (UniProt Entrada No. P00533, ID del gen NCBI: 1956), ERBB2 (UniProt Entrada No. P04626, ID del gen NCBI: 2064), ERBB3 (UniProt Entrada No. P21860, ID del gen NCBI: 190151), ERBB4 (UniProt Entrada No. Q15303, ID del gen NCBI: 600543), ETS1 (UniProt Entrada No. P14921, ID del gen NCBI: 2113), ETS2 (UniProt Entrada No. P15036, ID del gen NCBI: 2114), ETV6 (UniProt Entrada No. 41212, ID del gen NCBI: 2120), FGR (UniProt Entrada No. P09769, ID del gen NCBI: 2268), FOS (UniProt Entrada No. P0110, ID del gen NCBI: 2353), FYN (UniProt Entrada No. P06241, ID del gen NCBI: 2534), HCR (UniProt Entrada No. Q8TD31, ID del gen NCBI: 54535), HRAS (UniProt Entrada No. P01112, ID del gen NCBI: 3265), JUN (UniProt Entrada No. P05412, ID del gen NCBI: 3725), KRAS (UniProt Entrada No. P01116, ID del gen NCBI: 3845), LCK (UniProt Entrada No. P06239 ID del gen NCBI: 3932), LYN (UniProt Entrada No. P07948, ID del gen NCBI: 4067), MDM2 (UniProt Entrada No. Q00987, ID del gen NCBI: 4193), MLL1 (UniProt Entrada No. Q03164, ID del gen NCBI: 4297), MLL2 (UniProt Entrada No. 014686, ID del gen NCBI: 8085), MLL3 (UniProt Entrada No. Q8NEZ4, ID del gen NCBI: 58508), MYB (UniProt Entrada No. P10242, ID del gen NCBI: 4602), MYC (UniProt Entrada No. P01106, ID del gen NCBI: 4609), MYCL1 (UniProt Entrada No. P12524, ID del gen NCBI: 4610), MYCN (UniProt Entrada No. P04198, ID del gen NCBI: 4613), NRAS (UniProt Entrada No. P01111, ID del gen NCBI: 4893), PIM1 (UniProt Entrada No. P11309, ID del gen NCBI: 5292), PML (UniProt Entrada No. P29890, ID del gen NCBI: 5371), RET (UniProt Entrada No. P07949, ID del gen NCBI: 5979), SRC (UniProt Entrada No. P12931, ID del gen NCBI: 6714), TAL1 (UniProt Entrada No. P17542, ID del gen NCBI: 6886), TAL2 (UniProt Entrada No. Q16559, ID del gen NCBI: 6887), TCL3 (UniProt Entrada No. P31314, ID del gen NCBI: 3195), TCL5 (UniProt Entrada No. P17542, ID del gen NCBI: 6886), y YES (UniProt Entrada No. P07947, ID del gen NCBI: 7525)); proteínas superadoras de tumores (por ejemplo, BRCA1 (UniProt Entrada No. P38398, ID del gen NCBI: 672), BRCA2 (UniProt Entrada No. P51587, ID del gen NCBI: 675), MADH4 (UniProt Entrada No. Q13485, ID del gen NCBI: 4089), MCC (UniProt Entrada No. P23508, ID del gen NCBI: 4163), NF1 (UniProt Entrada No. P21359, ID del gen NCBI: 4763), NF2 (UniProt Entrada No. P35240, ID del gen NCBI: 4771), RB1 (UniProt Entrada No. P06400, ID del gen NCBI: 5925), TP53 (UniProt Entrada No. P04637, ID del gen NCBI: 7157), PLK1 (UniProt Entrada No. P53350, ID del gen NCBI: 9606), proteína de unión a KIF1 (UniProt Entrada No. Q96EK5, ID del gen NCBI: 9606), y WT1 (UniProt Entrada No. P19544, ID del gen NCBI: 4790)); lipoproteínas (por ejemplo, apolipoproteína B (ApoB100, UniProt Entrada No. P04114, ID del gen NCBI: 338)); enzimas (por ejemplo, ACC sintasas y oxidasas, ACP desaturasas e hidroxilasas, ADP-glucosa piroforilasas, ATPasas, alcohol deshidrogenasas, amilasas, amiloglucosidasas, catalasas, celulasas, chalcona sintasas, quitinasas, ciclooxigenasas, descarboxilasas, dextrinasas, ADN y ARN polimerasas, galactosidasas, glucanasas, glucosa oxidasas, almidón sintasas unidas a gránulos, GTPasas, helicasas, hemicelulasas, integrasas, inulinasas, invertasas, isomerases, quinasas (por ejemplo, PLK1 (UniProt Entrada No. P53350, ID del gen NCBI: 9606)), lactasas, ligasas (por ejemplo, proteína 2 que contiene repetición de dedo anular y WD (RFWD2), también conocida como COP1), lipasas, lipoxigenasas, lisozimas, nopalinas sintasas, octopina sintasas, pectinesterasas, peroxidasas, fosfatasa, fosfolipasas, fosforilasas, fitasas, sintasas reguladoras del crecimiento de las plantas, poligalacturonasas, proteinasas y peptidasas, pullanasas, recombinasas, transcriptasas reversas, ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasas (RuBisCos), topoisomerases, transferasas, tales como hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa 1 (HPRT1) y xilanasas).

El hígado es uno de los tejidos diana más importantes para la terapia con ácido nucleico dado su papel central en el metabolismo (por ejemplo, el metabolismo de las lipoproteínas en diversas hipercolesterolemias) y la secreción de proteínas circulantes (por ejemplo, factores de coagulación en la hemofilia). Además, los trastornos adquiridos, tales como la hepatitis crónica y la cirrosis, son comunes y también pueden tratarse potencialmente con terapias hepáticas basadas en polinucleótidos. Un número de enfermedades o condiciones que afectan o son afectadas por el hígado son potencialmente tratadas mediante la anulación (inhibición) de la expresión génica en el hígado. Se pueden seleccionar enfermedades y condiciones hepáticas de ejemplo de la lista que comprende: cánceres de hígado (que incluyen carcinoma hepatocelular, HCC), infecciones virales (que incluyen hepatitis), trastornos metabólicos (que incluyen hiperlipidemia y diabetes), fibrosis y daño hepático agudo. Los objetivos moleculares de ejemplo para la terapéutica hepática (por ejemplo, la terapéutica direccionada al HCC en particular), y opcionalmente para la terapéutica que aborda otros objetivos, enfermedades y/o trastornos, incluidos otros tipos de cáncer, incluyen CSN5

(UniProt Entrada No. Q92905, ID del gen NCBI: 10987), CDK6 (UniProt Entrada No. Q00534, ID del gen NCBI: 1021), ITGB1 (UniProt Entrada No. P05556, ID del gen NCBI: 3688), MYC (UniProt Entrada No. P01106, ID del gen NCBI: 4609), TGFβ1 (UniProt Entrada No. P01137, ID del gen NCBI: 7040), Cilicina D1 (UniProt Entrada No. Q9H014, ID del gen NCBI: 595), hepcidina (UniProt Entrada No. P81172, ID del gen NCBI: 57817), PCSK9 (UniProt Entrada No. Q8NBP7 , ID del gen NCBI: 255738) y transtiretina (TTR, UniProt Entrada No. P02766, ID del gen NCBI: 7276), entre otros.

Las formulaciones de la invención pueden dirigirse opcionalmente a tejidos normales (por ejemplo, tejido hepático normal), así como a diversos modelos (por ejemplo, modelos ortotópicos de hígado, modelos subcutáneos de hígado, etc.).

Un objetivo de ejemplo para las formulaciones de la invención es la Apolipoproteína B (ApoB), que se encuentra en diversas clases de lipoproteínas: quilomicrones, lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), lipoproteínas de densidad intermitente (IDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL). ApoB funciona como una señal de reconocimiento para la unión celular y la internalización de partículas de LDL por el receptor ApoB/E. Una acumulación o exceso de lipoproteínas que contienen apolipoproteína B puede conducir a trastornos relacionados con los lípidos, tal como la aterosclerosis. Las terapias formuladas que reducen la ApoB pueden ser útiles para tratar los trastornos relacionados con los lípidos. Se ha demostrado que una terapia basada en ácidos nucleicos, en forma de terapia antisentido, reduce los niveles de ApoB en ratones in vivo, y los tratamientos redujeron subsecuentemente los niveles de colesterol y triglicéridos en suero (Publicación U.S. No. 2003/0215943). Estos resultados demostraron una subregulación moderada de ApoB y su uso como objetivo en el tratamiento de trastornos relacionados con los lípidos.

Otro objetivo de ejemplo para las formulaciones de la invención es la proteína C, que puede ser direccionada, por ejemplo, para el tratamiento de la hemofilia.

Suministro de un agente terapéutico.

Las formulaciones de la invención pueden usarse para suministrar un agente terapéutico (por ejemplo, agentes polianiónicos, ácidos nucleicos o agentes de iARN) a las células. El agente suministrado por la formulación puede usarse para silenciar genes (por ejemplo, in vitro o in vivo en un sujeto) o para tratar o tratar profilácticamente una enfermedad (por ejemplo, cáncer) en un sujeto.

El suministro de un agente terapéutico puede evaluarse utilizando cualquier método útil. Por ejemplo, el suministro con una formulación que contiene el compuesto de la invención puede evaluarse mediante 1) anulación de un gen diana o 2) toxicidad o tolerabilidad, en comparación con un control a una dosis equivalente. Estas evaluaciones se pueden determinar con cualquier combinación útil de lípidos en la formulación, tales como cualquier lípido catiónico descrito en el presente documento (por ejemplo, DOTAP, DODMA, DLinDMA y/o DLin-KC2-DMA) en combinación con un compuesto de la invención (por ejemplo, cualquier compuesto en la Tabla 1). En realizaciones particulares, se observa una mejora en el suministro de un agente terapéutico cuando se usa un compuesto de la invención, donde la mejora es más del 25% (por ejemplo, mejora de más de 2 veces, 5 veces, 10 veces, 100 veces o de 1000 veces en el suministro), en comparación con un control.

Suministro de agentes de iARN

El silenciamiento de iARN se puede usar en una amplia variedad de células, donde las líneas celulares HeLa S3, COS7, 293, NIH/3T3, A549, HT-29, CHO-K1 y MCF-7 son susceptibles a algún nivel de silenciamiento de ARNip. Adicionalmente, la supresión en células de mamíferos puede ocurrir a nivel de ARN con especificidad para los genes diana, donde se ha observado una fuerte correlación entre ARN y supresión de proteínas. Por consiguiente, los compuestos de la invención, y sus formulaciones, pueden usarse para administrar un agente de iARN a una o más células (por ejemplo, in vitro o in vivo). Los agentes de iARN de ejemplo incluyen ARNip, ARNhC, ARNbc, miARN y ARNsiD, como se describe aquí.

Anulación de objetivo in vitro

El suministro del agente iARN se puede evaluar por cualquier método útil. Por ejemplo, las formulaciones que incluyen un agente terapéutico pueden transfectarse in vitro en modelos de cultivo celular (por ejemplo, células HeLa), donde las mediciones de punto final incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: (i) cuantificación de ARNm usando qPCR ; (ii) cuantificación de proteínas usando transferencia Western; (iii) internalización celular marcada del agente y/o un lípido catiónico de amino-amina o amino-amida de la invención. La captación o suministro puede evaluarse tanto por el alcance como por la duración de los puntos finales mencionados anteriormente. Antes del suministro, la formulación puede diluirse en medios de cultivo celular a temperatura ambiente durante aproximadamente 30 minutos, y la concentración final puede variar de 0 a 50 nM del agente terapéutico o el lípido catiónico de amino-amina o amino-amida en experimentos de respuesta a la dosis. Para los experimentos en el transcurso del tiempo, se puede estudiar una concentración óptima del experimento de dosis para diversos tiempos de incubación, por ejemplo, de 30 minutos a 7 días.

La funcionalidad de la carga útil polianiónica y las formulaciones de lípidos también se pueden probar marcando diferencialmente el compuesto lipídico y el agente terapéutico con etiquetas fluorescentes y realizando estudios de

colocalización fluorescente. La capacidad de los compuestos de la invención para suministrar cargas útiles polianiónicas y/o un marcador fluorescente adjunto se puede evaluar midiendo tanto la fluorescencia total dentro de la célula como midiendo la fluorescencia que no está asociada de manera estable con compartimentos endosómicos o lisosómicos (para funcionar, se requiere que los agentes terapéuticos que desencadenan el iARN no solo lleguen al interior de la célula, sino que también lleguen al citoplasma de la célula). La realización de estudios de localización de fluorescencia y tráfico celular se ha descrito en la técnica (Lu, et al., Mol. Pharm. 6 (3): 763, 2009; McNaughton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106 (15): 6111, 2009).

Suministro a tipos de células diana particulares y tejidos diana

Los compuestos de la invención pueden usarse para suministrar agentes terapéuticos a diversos órganos y tejidos para tratar diversas enfermedades. Tejidos u órganos específicos de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, hígado, páncreas, pulmón, próstata, riñón, médula ósea, bazo, timo, nodos linfáticos, cerebro, médula espinal, corazón, músculo esquelético, piel, mucosa oral, esófago, estómago, íleon, intestino delgado, colon, vejiga, cuello uterino, ovario, testículo, glándula mamaria, glándula adrenal, tejido adiposo (blanco y/o marrón), sangre (por ejemplo, células hematopoyéticas, tales como células progenitoras hematopoyéticas humanas, células madre hematopoyéticas humanas, células CD34+, células CD4+), linfocitos y otras células de linaje sanguíneo.

Terapia contra el cáncer

Los compuestos de la invención se pueden usar para suministrar uno o más agentes terapéuticos (por ejemplo, agentes de iARN) a un sujeto que tiene cáncer o está en riesgo de desarrollar un cáncer (por ejemplo, un mayor riesgo de al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%). Los cánceres de ejemplo incluyen cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular, hepatoblastoma, colangiocarcinoma, angiosarcoma o hemangiosarcoma) o neuroblastoma. Las enfermedades neoplásicas de ejemplo y las complicaciones asociadas incluyen, pero no se limitan a, carcinomas (por ejemplo, pulmón, mama, páncreas, colon, hepatocelular, renal, tracto genital femenino, células escamosas, carcinoma in situ), linfoma (por ejemplo, linfoma histiocítico, linfoma no Hodgkin), síndromes MEN2, neurofibromatosis (incluida la neoplasia de células de Schwann), síndrome mielodisplásico, leucemia, angiogénesis tumoral, cánceres de tiroides, hígado, huesos, piel, cerebro, sistema nervioso central, páncreas, pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)), mama, colon, vejiga, próstata, tracto gastrointestinal, endometrio, trompas de Falopio, testículos y ovario, tumores del estroma gastrointestinal (GIST), tumores de próstata, tumores de mastocitos (incluidos los tumores mastocitos caninos), mielofibrosis mieloide aguda, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, melanoma, mastocitosis, gliomas, glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, sarcomas (por ejemplo, sarcomas de origen neuroectodérmico o leiomiomas), metástasis de tumores a otros tejidos e hipoxia inducida por quimioterapia.

Administración y dosificación

La presente invención también se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un compuesto o una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición, tal como una formulación que incluye un agente terapéutico (por ejemplo, un agente de iARN). La composición puede formularse para uso en una variedad de sistemas de suministro de fármacos. También se pueden incluir uno o más excipientes o vehículos fisiológicamente aceptables en la composición para una formulación adecuada. Las formulaciones adecuadas para uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Filadelfia, Pensilvania, 17ª edición, 1985. Para una breve revisión de los métodos para el suministro de fármacos, véase, por ejemplo, Langer, Science 249: 1527- 1533, 1990.

Las composiciones farmacéuticas están destinadas a la administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como por medios transdérmicos, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, por inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea), o por ingestión oral, o por aplicación tópica o inyección intraarticular en áreas afectadas por la condición vascular o cancerosa. Las vías de administración adicionales incluyen la administración intravascular, intraarterial, intratumoral, intraperitoneal, intraventricular, intraepidural, así como nasal, oftálmica, intraescleral, intraorbital, rectal, tópica o por inhalación de aerosol. La administración de liberación sostenida también se incluye específicamente en la invención, por medios tales como inyecciones de depósito o implantes o componentes erosionables. Por lo tanto, la invención proporciona composiciones para administración parenteral que comprenden los agentes mencionados anteriormente disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso, por ejemplo, agua, agua regulada, solución salina, PBS y similares. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste y regalamiento del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares. La invención también proporciona composiciones para administración oral, que pueden contener ingredientes inertes tales como aglutinantes o agentes de relleno para la formulación de una tableta, una cápsula y similares. Adicionalmente, esta invención proporciona composiciones para administración local, que pueden contener ingredientes inertes tales como disolventes o emulsionantes para la formulación de una crema, un ungüento y similares.

Estas composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden filtrarse estérilmente. Las soluciones acuosas resultantes pueden empacarse para uso tal cual, o liofilizarse, la preparación liofilizada se combina con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de las preparaciones típicamente estará entre 3 y 11, más preferiblemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y lo más preferiblemente entre 7 y 8, tal como 7 a 7.5. Las composiciones resultantes en forma sólida se pueden empacar en múltiples unidades de dosis única, cada una de las cuales contiene una cantidad fija del agente o agentes mencionados anteriormente, tal como en un paquete sellado de tabletas o cápsulas. La composición en forma sólida también se puede empacar en un recipiente para una cantidad flexible, tal como en un tubo exprimible diseñado para una crema o ungüento de aplicación tópica.

Las composiciones que contienen una cantidad efectiva se pueden administrar para tratamientos profilácticos o terapéuticos. En aplicaciones profilácticas, las composiciones se pueden administrar a un paciente con una predisposición clínicamente determinada o una mayor susceptibilidad al desarrollo de un tumor o cáncer. Las composiciones de la invención pueden administrarse al paciente (por ejemplo, un humano) en una cantidad suficiente para retrasar, reducir o preferiblemente prevenir la aparición de enfermedad clínica o tumorigénesis. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones se administran a un paciente (por ejemplo, un humano) que ya padece un cáncer en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la condición y sus complicaciones. Una cantidad adecuada para lograr este propósito se define como una "dosis terapéuticamente efectiva", una cantidad de un compuesto suficiente para mejorar sustancialmente algunos síntomas asociados con una enfermedad o condición médica. Por ejemplo, en el tratamiento del cáncer, un agente o compuesto el cual disminuye, previene, retrasa, suprime o detiene cualquier síntoma de la enfermedad o condición sería terapéuticamente efectivo. No se requiere una cantidad terapéuticamente efectiva de un agente o compuesto para curar una enfermedad o condición, pero proporcionará un tratamiento para una enfermedad o condición tal que el inicio de la enfermedad o condición se retrase, dificulte o prevenga, o los síntomas de la enfermedad o condición mejoran o el término de la enfermedad o condición cambia o, por ejemplo, es menos grave o la recuperación se acelera en un individuo.

Las cantidades efectivas para este uso pueden depender de la gravedad de la enfermedad o condición y el peso y el estado general del paciente, pero generalmente varían de aproximadamente 0.5 mg a aproximadamente 3000 mg del agente o agentes por dosis por paciente. Los regímenes adecuados para la administración inicial y las administraciones de refuerzo se tipifican por una administración inicial seguida de dosis repetidas en uno o más intervalos por hora, diariamente, semanalmente o mensualmente por una administración subsecuente. La cantidad efectiva total de un agente presente en las composiciones de la invención puede administrarse a un mamífero como una dosis única, ya sea como un bolo o mediante infusión durante un período de tiempo relativamente corto, o puede administrarse usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que se administran múltiples dosis durante un período de tiempo más prolongado (por ejemplo, una dosis cada 4-6, 8-12, 14-16 o 18-24 horas, o cada 2-4 días, 1-2 semanas, una vez un mes). Alternativamente, se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones terapéuticamente efectivas en la sangre.

La cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más agentes presentes dentro de las composiciones de la invención y utilizados en los métodos de esta invención aplicados a mamíferos (por ejemplo, humanos) puede ser determinada por el experto en la técnica con consideración de las diferencias individuales en edad, peso, y la condición del mamífero. Los agentes de la invención se administran a un sujeto (por ejemplo, un mamífero, tal como un humano) en una cantidad efectiva, que es una cantidad que produce un resultado deseable en un sujeto tratado (por ejemplo, la desaceleración o la remisión de un cáncer o trastorno neurodegenerativo). Tales cantidades terapéuticamente efectivas pueden ser determinadas empíricamente por los expertos en la técnica.

El paciente también puede recibir un agente en el rango de aproximadamente 0.1 a 3,000 mg por dosis una o más veces por semana (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 o más veces por semana), dosis de 0.1 a 2,500 (por ejemplo, 2,000, 1,500, 1,000, 500, 100, 10, 1, 0.5 o 0.1) mg por semana. Un paciente también puede recibir un agente de la composición en el rango de 0.1 a 3.000 mg por dosis una vez cada dos o tres semanas.

La cantidad (dosis) de formulación y carga útil (por ejemplo, ARNsID) que se va a administrar se puede determinar empíricamente. En ciertas realizaciones, se observa la anulación efectiva de la expresión génica usando 0.0001-10 mg/kg de peso animal de la carga útil de ácidos nucleicos y 0.001-200 mg/kg de formulación de suministro de peso animal. Una cantidad de ejemplo en ratones es 0.1-5 mg/kg de carga útil de ácidos nucleicos y 0.7-100 mg/kg de formulación de administración. Opcionalmente, se administra una formulación de suministro de aproximadamente 1-50 mg/kg. La cantidad de carga útil (por ejemplo, ARNsID) se incrementa fácilmente porque típicamente no es tóxica en dosis más grandes.

En ciertas realizaciones, las dosis pueden administrarse diariamente durante un período de días, semanas o más (por ejemplo, entre uno y 28 días o más), o solo una vez, o en otros intervalos, dependiendo de, por ejemplo, indicaciones agudas versus crónicas, etc.

Las administraciones individuales o múltiples de las composiciones de la invención que comprenden una cantidad efectiva se pueden llevar a cabo con niveles de dosis y patrones que son seleccionados por el médico tratante. La dosis y el programa de administración se pueden determinar y ajustar con base en la gravedad de la enfermedad o condición en el paciente, que se puede monitorizar a lo largo del curso del tratamiento de acuerdo con los métodos practicados comúnmente por los médicos o los descritos aquí.

Los compuestos y formulaciones de la presente invención pueden usarse en combinación ya sea con métodos convencionales de tratamiento o terapia o pueden usarse por separado de los métodos convencionales de tratamiento o terapia. Cuando los compuestos y formulaciones de esta invención se administran en terapias combinadas con otros agentes, se pueden administrar de manera secuencial o concurrente a un individuo. Alternativamente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención incluyen una combinación de un compuesto o formulación de la presente invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, como se describe aquí, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

Los agentes formulados se pueden empacar juntos como un kit. Los ejemplos no limitantes incluyen kits que contienen, por ejemplo, dos píldoras, una píldora y un polvo, un supositorio y un líquido en un vial, dos cremas tópicas, etc. El kit puede incluir componentes opcionales que ayudan en la administración de la dosis unitaria a pacientes, tales como viales para reconstituir formas en polvo, jeringas para inyección, sistemas de administración IV personalizados, inhaladores, etc. Además, el kit de dosis unitaria puede contener instrucciones para la preparación y administración de las composiciones. El kit puede fabricarse como una dosis unitaria de uso único para un paciente, usos múltiples para un paciente particular (a una dosis constante o en la que los compuestos individuales pueden variar en potencia a medida que avanza la terapia); o el kit puede contener múltiples dosis adecuadas para la administración a múltiples pacientes ("empaquete a granel"). Los componentes del kit pueden ensamblarse en cajas de cartón, empaques tipo blíster, botellas, tubos y similares.

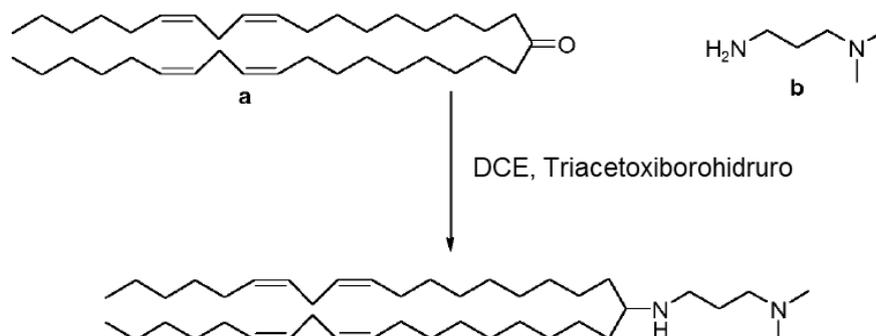
Medición de los valores de pKa de lípidos en nanopartículas ensambladas

Las diferentes propiedades fisicoquímicas de los lípidos determinan en gran medida el comportamiento de los lípidos cuando están presentes en diferentes entornos. Una de tales propiedades importantes es la constante de ionización (Ka) del lípido. El pKa intrínseco del lípido puede no ser una representación correcta de su comportamiento cuando está presente en una nanopartícula ensamblada. Cuando está presente en un ambiente acuoso, el lípido experimenta un ambiente con alta constante dieléctrica, mientras que en una nanopartícula/vesícula ensamblada, está rodeado de lípidos que proporcionan baja constante dieléctrica. Además, los lípidos circundantes, el colesterol y los lípidos PEGilados influyen en el pKa aparente de la formulación. Dado que la naturaleza de la interacción entre los lípidos catiónicos y el ácido nucleico es electrostática, el pKa aparente de la formulación determina la encapsulación del ácido nucleico en la nanopartícula y también su subsecuente liberación intracelular.

El método de fluorescencia TNS puede usarse para determinar el pKa aparente del lípido en la formulación. El TNS (ácido 2-(p-toluidino)-6-naftalenosulfónico) es un colorante fluorescente cargado negativamente cuya fluorescencia se inactiva en presencia de agua. TNS se somete a partición en una membrana cargada positivamente y esto da como resultado un aumento en la fluorescencia debido a la eliminación de agua. El aumento de la fluorescencia se puede utilizar para estimar la ionización de un lípido catiónico cuando está presente en un entorno de pH diferente. Los métodos para determinar pKa usando TNS son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en los Ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis de lípido de amino-amina L-1 (Referencia) a partir de una cetona y una amina primaria

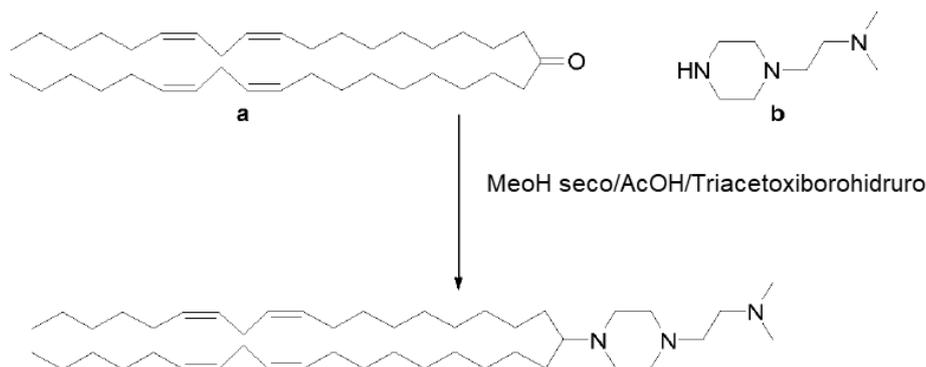


La cetona a (1 eq.) y la amina b (1.1 eq.) se disolvieron en dicloroetano en un matraz seco, todo bajo una atmósfera de N₂ y se agitó a temperatura ambiente (TA) durante 30 minutos. Se añadió triacetoxiborohidruro (1,5 eq.) Y la mezcla se agitó durante la noche a temperatura ambiente. La reacción se detiene con NaOH 1 N. La reacción detenida se diluyó con DCM y se extrajo, una vez con agua, una vez con salmuera, y la fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄. La solución seca se filtró y se concentró en un evaporador rotatorio. El residuo se purificó por columna de sílica (gradiente escalonado comenzando con 1% de MeOH/DCM a 5% de MeOH/DCM, los rendimientos variaron de 60% a 90%) para

producir el compuesto L-1. ^1H RMN (CDCl_3): δ 5.41-5.30 (m, 8H), 3.12 (t, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.77 (t, 6H), 2.48 (bs, 6H), 2.20 (m, 2H), 2.05 (q, 8H), 1.80-1.69 (m, 4H), 1.38-1.25 (m, 40H), 0.89 (t, 3H); MS: electroaspersión: $[\text{M}+1]$ teoría: 613, encontrado: 613.

5 Al modificar las etapas sintéticas de este ejemplo, se prepararon lípidos de amino-amina adicionales, tales como los proporcionados en las Figuras 2A, 2B y 3

Ejemplo 2: Síntesis del lípido de amino-amina L-2 (Referencia) a partir de una cetona y una amina secundaria

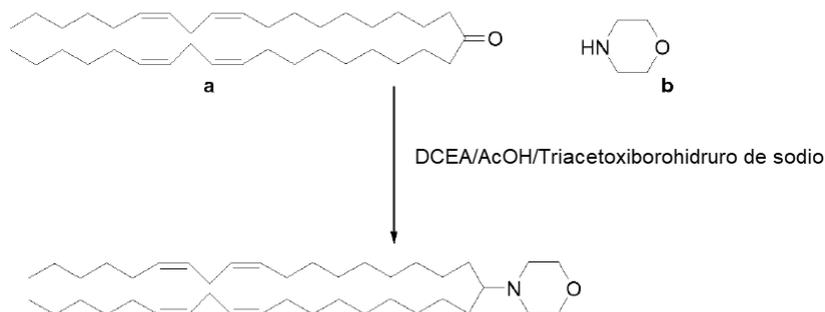


10 La cetona a (1 eq.) Se disolvió en MeOH seco en un matraz seco, todo bajo una atmósfera de N_2 . Se añadió la amina b (1.1 eq.), Seguido de triacetoxiborohidruro (1.5 eq.) y AcOH (1 eq.), y la reacción se agitó durante la noche a TA. La reacción se diluyó con DCM y se extrajo, una vez con agua, una vez con salmuera, y la fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 . La solución seca se filtró y se concentró en un rotoevaporador. El residuo se purificó por columna de sílica (gradiente escalonado que comienza con 1% de MeOH/DCM a 5% de MeOH/DCM, los rendimientos varían de 60% a 90%) para producir el compuesto L-2. ^1H RMN: (CD_3OD) δ 5.39-5.30 (m, 8H), 2.78 (t, 4H), 2.59-2.52 (m, 10H), 2.33 (bs, 8H), 2.07 (q, 8H), 1.25 (m, 2H), 1.40-1.26 (m, 40H), 0.914 (t, 6H); MS: electroaspersión pos. $[\text{M}+1]$ teoría 668, encontrado 668.

15 Al modificar las etapas sintéticas de este ejemplo, se prepararon lípidos de amino-amina adicionales, tales como los análogos de L-2 y L-6 proporcionados en las Figuras 4 y 5.

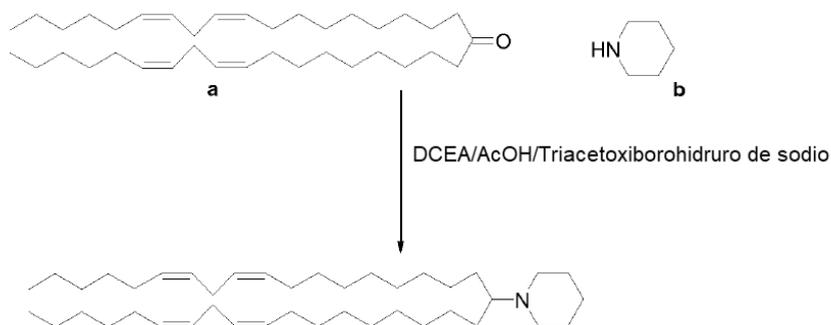
Ejemplo 3: Síntesis del lípido L-46 (Referencia) a partir de una cetona y morfolina

20



25 A una mezcla de cetona a (2.66 g; 5.05 mmol), morfolina b (1.34 ml; 15 mmol) y AcOH (1.77 ml; 30 mmol) en DCE (12 ml) se añadió $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$ (1.6 g; 7.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 72 h. La prueba de TLC (sílica gel; elución con hexano:EtAc-Et₃N 95:5) indicó aproximadamente 45% de conversión. La mezcla de reacción se diluyó con K_2CO_3 acuoso al 5% y se extrajo con DCM. El disolvente se secó sobre K_2CO_3 y se evaporó en un rotoevaporador. El residuo se separó por LC sobre sílica gel (elución con hexano:EtAc 90:0). El producto deseado L-46 se obtuvo con un rendimiento del 39% (1.18 g) y fue puro por RMN.

Ejemplo 4: Síntesis del lípido L-47 (Referencia) a partir de una cetona y piperidina



5 A una mezcla de dilinoleilcetona a (3.99 g; 7.58 mmol), piperidina b (2.25 ml; 22 mmol) y AcOH (1.33 ml; 23 mmol) en DCE (24 ml) se añadió $\text{NaBH}(\text{AcO})_3$ (2.4 g; 11,3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 96 h. La prueba de TLC (sílica gel; elución con hexano: EtAc-Et₃N 95: 5) indicó alrededor del 35% de conversión. La mezcla de reacción se diluyó con K_2CO_3 acuoso al 5% y se extrajo con DCM. El disolvente se secó sobre K_2CO_3 y se evaporó en un rotoevaporador. El residuo se separó por LC sobre sílica gel (la elución fue con hexano:EtAc 90:0. El producto deseado L-47 se obtuvo con un rendimiento del 29% (1.30 g) y era puro según RMN.

Mediante el uso de los métodos proporcionados en este Ejemplo, así como en el Ejemplo 3, se pueden preparar lípidos catiónicos que tienen diversos grupos de cabeza, como los proporcionados en la Figura 9.

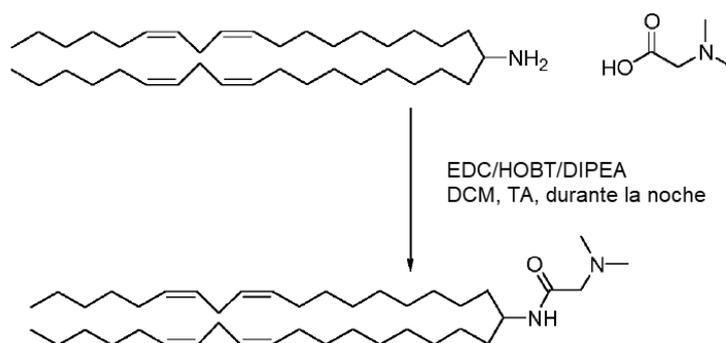
10 Ejemplo 5: Síntesis de lípidos catiónicos de amida a partir de una amina primaria y un ácido carboxílico

15 Los siguientes derivados de dilinoleilamida se prepararon usando el siguiente procedimiento general. A una solución de dilinoleilamina (338 mg; 0.64 mmol), se combinaron HOBt (65 mg; 0.5 mmol), aminoácido (1 mmol) y DIPEA (1 eq.) en DCM (15 g/ml) seguido de la adición de EDC (1.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La TLC indicó que la reacción se había completado. La mezcla de reacción se diluyó con K_2CO_3 al 0.5% en agua y se extrajo con DCM. Después de la concentración en un rotoevaporador, el producto crudo se purificó por cromatografía sobre sílica gel (gradiente de hexano: Et₃N 95:5 a hexano: CHCl_3 :Et₃N 46:44:5). Los rendimientos obtenidos fueron entre 80-85%.

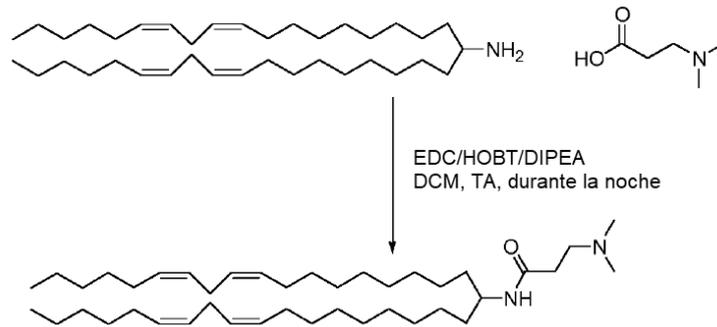
Los derivados de dioleilo también se prepararon con base en los esquemas que se proporcionan a continuación:

Síntesis del lípido L-30 a partir de una amina primaria y un ácido carboxílico

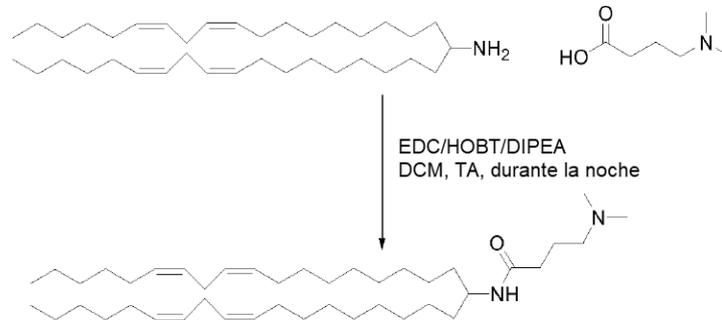
20



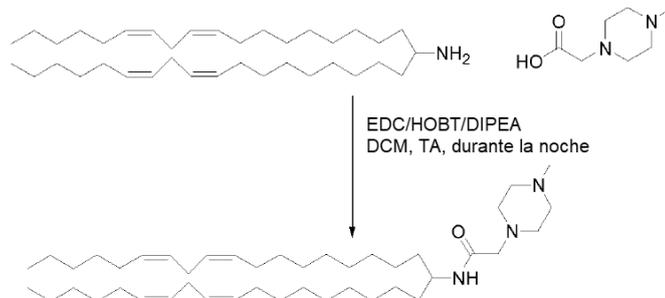
Síntesis del lípido L-31 (Referencia) a partir de una amina primaria y un ácido carboxílico



Síntesis del lípido L-32 (Referencia) a partir de una amina primaria y un ácido carboxílico



5 Síntesis del lípido L-42 (referencia) a partir de una amina primaria y un ácido carboxílico



Al modificar las etapas sintéticas de este ejemplo, se prepararon lípidos adicionales de amida-amina, tales como los proporcionados en la Figura 6-8.

10 Ejemplo 6: preparación de formulaciones de lípidos de amina

Para probar la eficacia de los lípidos L-1 (Ref.) y L-2 (Ref.), las formulaciones se prepararon con un lípido catiónico (DODMA), un lípido neutro (DSPC), un conjugado de PEG-lípido (PEG-DMPE y PEG-DMG) y colesterol con un agente de iARN (ARNsiD para HPRT1), que tiene la siguiente estructura:



15 en la que las letras mayúsculas significan nucleótidos de ARN, las letras mayúsculas subrayadas significan un nucleótido 2'-O-metil-ARN y las letras minúsculas significan un nucleótido de ADN.

Preparación de cadenas de ARNsiD: síntesis y purificación de oligonucleótidos

Se sintetizaron cadenas de ARN individuales y se purificaron por HPLC de acuerdo con métodos estándar (Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa). Por ejemplo, los oligonucleótidos de ARN se sintetizaron usando química de fosoramidita en fase sólida, se desprotegeron y desalaron en columnas NAP-5 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) usando técnicas estándar (Damha y Olgivie, *Methods Mol. Biol.* 20:81, 1993; Wincott et al., *Nucleic Acids Res.* 23: 2677, 1995). Los oligómeros se purificaron usando cromatografía líquida de alto rendimiento por intercambio iónico (IE-HPLC) en una columna Amersham Source 15Q (1.0 cm x 25 cm; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) usando un gradiente lineal en etapas de 15 min. El gradiente era de 90:10 reguladores A:B a 52:48 reguladores A:B, donde el regulador A es Tris 100 mM pH 8.5 y el regulador B es Tris 100 mM pH 8.5, NaCl 1 M. Las muestras se monitorizaron a 260 nm, y los picos correspondientes a las especies de oligonucleótidos de longitud completa se recogieron, agruparon, desalaron en columnas NAP-5 y se liofilizaron.

La pureza de cada oligómero se determinó por electroforesis capilar (CE) en un Beckman PACE 5000 (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California). Los capilares CE tenían un diámetro interno de 100 µm y contenían gel ssDNA 100R (Beckman-Coulter). Típicamente, se inyectaron aproximadamente 0.6 nmoles de oligonucleótido en un capilar, se ejecutaron en un campo eléctrico de 444 V/cm y se detectaron mediante absorbancia UV a 260 nm. El regulador de ejecución de tris-borato-7 M-urea desnaturalizante se adquirió de Beckman-Coulter. Se obtuvieron oligoribonucleótidos que son al menos 90% puros según lo evaluado por CE para uso en los experimentos descritos a continuación. La identidad del compuesto se verificó mediante espectrometría de masas de tiempo de vuelo con desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI-TOF) en una estación de trabajo de biospectrometría Voyager DETM (Applied Biosystems, Foster City, California) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se obtuvieron masas moleculares relativas de todos los oligómeros, frecuentemente dentro del 0.2% de la masa molecular esperada.

Preparación de dúplex de ARNsID

Los oligómeros de ARN monocatenario (ARNmc) se resuspendieron, por ejemplo, a una concentración de 100 µM en regulador dúplex que consiste en acetato de potasio 100 mM, HEPES 30 mM, pH 7.5. Las cadenas en sentido y antisentido complementarias se mezclaron en cantidades molares iguales para producir una solución final de, por ejemplo, dúplex 50 µM. Las muestras se calentaron hasta 100 °C durante 5 minutos en regulador de ARN (IDT) y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente antes de su uso. Los oligómeros de ARN bicatenario (ARNbc) se almacenaron a -20 °C. Los oligómeros de ARN monocatenarios se almacenaron liofilizados o en agua libre de nucleasas a -80 °C.

Preparación de la formulación lipídica a base de vesículas.

Las partículas lipídicas se prepararon con el % en moles proporcionado en la Tabla 5. La relación total de lípidos a ARNsID fue de aproximadamente 1:7.

Tabla 5

Formulaciones	Composición			
L-1v (Ref.)	L-1 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	Colesterol (32.7%)
L-2v (Ref.)	L-2 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	Colesterol (32.7%)
L-5v (Ref.)	L-5 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	Colesterol (32.7%)
L-6v (Ref.)	L-6 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	Colesterol (32.7%)
L-30v (de acuerdo con la invención)	L-30 (57.2%)	PEG-DMPE (3%)	DSPC (7.1%)	Colesterol (32.7%)

Preparación del agente de unión a ARN y formulación de lípidos de transfección.

Las partículas lipídicas se prepararon con el % en moles proporcionado en la Tabla 6. La relación total de lípidos a ARNsID fue de aproximadamente 1:20.

Tabla 6

Formulaciones	Agentes de unión a ARN		Lípidos de transfección			
	L-1 (Ref.)	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-1 (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)
L-2 (Ref.)	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-2 (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)	Colesterol (33.0%)
DLinDMA	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	DLinDMA (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)	Colesterol (33.0%)
DLin-KC2-DMA	DLinDMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	DLin-KC2-DMA (21.6%)	PEG-DMG (2.8%)	DSPC (13.8%)	Colesterol (33.0%)

En las Tablas 5 y 6, PEG-DMPE es 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi(polietilenglicol)-2000] y PEG-DMG es (R)-3-[(ω-metoxi-PEG2000-carbamoil)]-1,2-di-O-tetradecil-sn-glicérido.

Ejemplo 7: rendimiento in vitro de formulaciones de lípidos de amina

- 5 Para evaluar la eficacia de diversas formulaciones de lípidos, se realizaron ensayos in vitro con moléculas de ARNsiD que se dirigen a HPRT1. Las formulaciones lipídicas se prepararon con ARNsiD para HPRT1, como se describió anteriormente en el Ejemplo 6.

Cultivo celular y transfección de ARN

- 10 Las células HeLa se obtuvieron de ATCC y se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (HyClone) suplementado con suero bovino fetal al 10% (HyClone) a 37 °C bajo 5% de CO₂. Las formulaciones de lípidos catiónicos de ARNbc de la invención se transfectaron en células HeLa mediante incubación con las formulaciones de la invención a una concentración final de 1 nM, 5 nM o 25 nM. Los ARNbc de Lipofectamine™ RNAiMAX (Invitrogen) se utilizaron como controles positivos a 0.1 nM o 1 nM. En resumen, 2.5 μL de una solución madre de 0.2 μM o 0.02 μM de cada ARNbc se mezcló con 47.5 μL de Opti-MEM I (Invitrogen). Para el control de Lipofectamine™, 2.5 μL de una solución madre de 0.2 μM o 0.02 μM de cada ARNbc se mezcló con 46.5 μL de Opti-MEM I (Invitrogen) y 1 μL de Lipofectamine™ RNAiMAX. La mezcla resultante de 50 μL se añadió en pozos individuales de placas de 12 pozos y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formaran los complejos ARNbc:Lipofectamine™ RNAiMAX.

- 20 Mientras tanto, las células HeLa se tripsinizaron y se resuspendieron en medio a una concentración final de aproximadamente 367 células/μL. Finalmente, se añadieron 450 μL de la suspensión celular a cada pozo (volumen final 500 μL) y las placas se colocaron en la incubadora durante 24 horas. Para los estudios de respuesta a la dosis, las concentraciones de las ARNbc variaron inicialmente de 10 pM a 100 nM. Para el estudio del curso temporal, se estudiaron tiempos de incubación de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 72 horas.

Valoración de inhibición

- 25 La anulación del gen diana se determinó mediante qRT-PCR, con valores normalizados a los tratamientos de control de expresión de HPRT, incluyendo Lipofectamine™ RNAiMAX solo (control de vehículo) o sin tratamiento.

Aislamiento y análisis de ARN

- 30 Las células se lavaron una vez con 2 ml de PBS, y el ARN total se extrajo usando RNeasy Mini Kit™ (Qiagen) y se eluyó en un volumen final de 30 μL. Se transcribió inversamente 1 μg de ARN total usando el Transcriptor 1st Strand cDNAKit™ (Roche) y hexámeros aleatorios siguiendo las instrucciones del fabricante. Una trigésima parte (0.66 μL) del ADNc resultante se mezcló con 5 μL de IQ Multiplex Powermix (Bio-Rad) junto con 3.33 μL de H₂O y 1 μL de una mezcla de 3 μM que contiene cebadores y sondas específicas para secuencias diana de genes humanos HPRT-1 (número de acceso NM 000194).

RT-PCR cuantitativa

- 35 Se usó un sistema en tiempo real CFX96 con un ciclador térmico C1000 (Bio-Rad) para las reacciones de amplificación. Las condiciones de PCR fueron: 95 °C durante 3 minutos; y luego ciclización a 95 °C, 10 segundos; y a

55 °C, 1 minuto durante 40 ciclos. Cada muestra se analizó por triplicado. Los niveles relativos de ARNm de HPRT se normalizaron a niveles de ARNm diana y se compararon con los niveles de ARNm obtenidos en muestras de control tratadas con el reactivo de transfección solo, o sin tratar. Los datos se analizaron utilizando el software Bio-Rad CFX Manager versión 1.0. Los datos de expresión se presentan como una comparación de la expresión bajo el tratamiento de la formulación de lípidos catiónicos de amino-amina de ARNbc versus la formulación de ARNbc sin el lípido catiónico de amino-aminas.

Resultados

La Figura 10 proporciona resultados de la anulación in vitro usando partículas lipídicas que contienen los lípidos de amino-amina L-1 o L-2. En general, tanto L-1 como L-2 inhibieron efectivamente los niveles de ARNm diana cuando se administraron a las células HeLa. En particular, L-1 proporcionó aproximadamente el 70% de los niveles restantes de ARNm a la concentración más baja de 1 nM. En consecuencia, los lípidos de amino-amina proporcionaron el suministro efectivo de los agentes de iARN cuando se administraron a las células HeLa mediante transfección. Por lo tanto, cualquiera de los compuestos de la invención, por ejemplo, cualquier lípido o formulaciones de los mismos, sería útil para el suministro de una carga útil polianiónica, por ejemplo, un agente de iARN o carga útil antisentido.

Ejemplo 8: rendimiento in vivo de formulaciones de lípidos de amina

Para evaluar adicionalmente el rendimiento de los lípidos, se realizaron experimentos in vivo con formulaciones que tienen ARNsID para HPRT1.

Las formulaciones se prepararon con los siguientes porcentajes aproximados: 20% en moles de uno de bien sea L-1, L-2, L-5, L-6, L-7, L-8, L-22 o L-30; 26% en moles de DODMA; 3% en moles de PEG2000-DMPE; 3% en moles de PEG2000-DMG; 13% en moles de DSPC; y 33 % en moles de colesterol. La formulación incluye además una relación ARNsID: lípidos totales de aproximadamente 1:20 (p/p).

Aproximadamente ratones hembra CD1 de 4 semanas de edad, recibieron una dosis única (ya sea 1 mg/kg o 5 mg/kg) de la formulación de partículas lipídicas con un volumen de dosificación de 10 µL/g de peso corporal mediante administración intravenosa a través de una vena de la cola. Después de 48 horas (posterior a la dosificación), los tejidos se recolectaron en RNALater (Qiagen). En el análisis de punto final, se aisló el ARN total del hígado de ratón para RT-qPCR. La muestra de ARN se calentó a 70 °C, durante 5 minutos con cebadores Oligo (dT) antes de RT. En la reacción de PCR, la expresión de mHPRT se normalizó con RPL23 (un gen de mantenimiento, utilizado como control aquí). Las figuras 11 y 12 muestran datos con barras de error con media ± SD para n = 5 animales/grupo.

En un primer conjunto de experimentos, la dosificación de la formulación de lípidos fue de 5 mg/kg en una dosis única (Figura 11). A esta dosificación, los compuestos L-1 y L-7 proporcionaron niveles de ARNm restantes de aproximadamente 80% a aproximadamente 90%. La adición de un grupo oxo en el grupo de cabeza, tal como en L-30, proporcionó un aumento drástico en el silenciamiento génico, como se evidencia por los niveles restantes de ARNm de aproximadamente el 15%. Además, los compuestos que tienen un heterociclilo en el grupo de cabeza (por ejemplo, L-2, L-5, L-6, L-8 y L-22) proporcionaron compuestos que tenían niveles de ARNm restantes de aproximadamente el 15% a aproximadamente el 45%. El % de anulación de ARNm para diversas formulaciones se muestra en la Tabla 7. La Tabla 7 muestra adicionalmente el valor de pKa para cada uno de los lípidos, medido por el método de fluorescencia TNS.

Para determinar los valores de pKa de los lípidos catiónicos de la invención, se incubaron formulaciones (concentración de 1 mM) en regulador de fosfato a diferentes valores de pH, a lo que se añadió TNS disuelto en DMSO (concentración final resultante de TNS 6 µM). La fluorescencia de la solución resultante se midió en un lector de placa de fluorescencia SpectraMax® M3 con una longitud de onda de excitación de 325 nm y una longitud de onda de emisión de 435 nm. La fluorescencia medida de TNS se ajustó con una función sigmoideal de tres parámetros que se muestra en la ecuación 1.

$$Función (f) = \frac{a}{\left(1 + \exp\left(\frac{pH - pKa}{b}\right)\right)}$$

(ecuación 1)

El pH al que se alcanzó la mitad de la fluorescencia máxima se informó como el pKa aparente de la formulación, donde a y b son parámetros adimensionales que reflejan la fluorescencia máxima observada y la pendiente de la función sigmoideal, respectivamente.

Tabla 7

Formulación lipídica	Valor pKa TNS	% de anulación de ARNm
L-1 (Ref.)	7.6	18.7
L-2 (Ref.)	6.7	75.6
L-5 (Ref.)	6.4	88.5
L-6(Ref.)	5.6	88.2
L-7 (Ref.)	7.1	8.9
L-8 (Ref.)	6.7	54.6
L-22 (Ref.)	7.0	66.3
L-24 (Ref.)	5.7	74.1
L-25 (Ref.)	6.5	76.8
L-26 (Ref.)	7.1	63.6
L-30 (de acuerdo con la invención)	5.8	86.4
L-31 (Ref.)	6.9	83.6
L-32 (Ref.)	7.0	41.0
L-35 (Ref.)	6.5	26.1
L-42 (Ref.)	6.7	66.6

En un segundo conjunto de experimentos, los compuestos L-2, L-5, L-6 y L-30 se evaluaron a una dosificación de 1 mg/kg o 5 mg/kg en una dosis única (Figura 12). En particular, L-5, L-6 y L-30 proporcionaron un silenciamiento genético efectivo a la dosis más baja de 1 mg/kg. En general, estos datos proporcionan diversos compuestos y dosificaciones de lípidos que son inhibidores efectivos de los niveles de ARN diana en un modelo in vivo.

Con el fin de evaluar la tolerabilidad de una formulación lipídica que contiene un lípido catiónico de amino-amina o amino-amida de la invención y un ARNbc, los ratones hembra CD-1 se inyectaron con formulaciones L-6 y L-30 [administradas en 2 dosis (qod) a una dosis de 10 mg/kg de ARNsiD, aproximadamente 200 mg/kg de dosis total de lípidos cada uno] y se recolectaron muestras de suero 48 horas después de la segunda dosis. Las muestras de suero se analizaron para un panel de evaluaciones de química clínica, incluidas las pruebas de función hepática (LFT) a través de la medición de enzimas alanina transaminasa (ALT) y aspartato transaminasa (AST). Se usó solución salina regulada con fosfato (PBS) como grupo de control del vehículo. La elevación de ALT y AST fue <3x del grupo PBS para las formulaciones L-6 y L-30. Tampoco se observaron cambios en el peso corporal o el hígado para las formulaciones L-6 y L-30. Por lo tanto, las formulaciones L-6 y L-30 fueron bien toleradas. Por lo tanto, cualquiera de los lípidos descritos en el presente documento, y sus formulaciones, serían útiles para la administración de uno o más agentes, por ejemplo, cargas útiles polianiónicas o antisentido.

Ejemplo 9: Uso de una formulación lipídica con ARNbc para reducir la expresión de un gen diana en un modelo de tumor animal subcutáneo

Con el fin de evaluar la eficiencia del suministro y la funcionalidad subsecuente de una formulación lipídica que contiene un lípido catiónico de amino-amina o amino-amida y un ARNbc, se utilizan modelos tumorales subcutáneos (s.c.) (Judge et al., J. Clin. Invest. 119: 661, 2009) con ciertas modificaciones. Los tumores Hep3B se establecen en ratones nu/nu machos por inyección s.c. de 3×10^6 células en 50 μ L de PBS en el flanco posterior izquierdo. Los ratones se asignaron al azar a grupos de tratamiento 10-17 días después de la siembra a medida que los tumores se volvieron palpables. La formulación lipídica de un ARNbc o control de vehículo se administra mediante inyección

intravenosa estándar (i.v.) a través de la vena lateral de la cola, calculada con base en mg ARNbc/kg de peso corporal de acuerdo con los pesos individuales de los animales. Los tumores se miden en 2 dimensiones (ancho × largo) para evaluar el crecimiento del tumor utilizando calibradores digitales. El volumen tumoral se calcula utilizando la ecuación $x * y * y/2$, donde x = diámetro más grande y y = diámetro más pequeño, y se expresa como media del grupo ± SD. Los tejidos tumorales también se eliminan de los animales de diferentes grupos de tratamiento y se confirma la anulación de genes. El volumen tumoral, la supervivencia y los datos de expresión de ARN se presentan como una comparación entre los tratamientos de la formulación lipídica de ARNbc versus una formulación de ARNbc sin un lípido catiónico de amino-amina o amino-amida.

Ejemplo 10: Uso de una formulación lipídica con ARNbc para reducir la expresión de un gen diana en el modelo de tumor ortotópico de hígado Hep3B

Con el fin de evaluar la eficiencia de la focalización y la funcionalidad subsecuente de una formulación de lípidos catiónicos de amino-amina o amino-amida de ARNbc, se utilizaron modelos tumorales intrahepáticos (Judge et al., J. Clin. Invest. 119: 661, 2009) con ciertas modificaciones. Los tumores hepáticos se establecieron en ratones mediante inyección intrahepática directa de células tumorales Hep3B. Se usaron ratones nu/nu machos como huéspedes para los tumores Hep3B. Manteniendo a los ratones bajo anestesia usando 2,2,2-tribromoetanol (Sigma), se realizó una sola incisión de 1 cm a través de la línea media debajo del esternón, y el lóbulo hepático lateral izquierdo se exteriorizó. Aproximadamente 2×10^6 células Hep3B suspendidas en 40 µL de PBS al 50%/Matrigel™ (BD) al 50% se inyectaron lentamente en el lóbulo en un ángulo poco profundo usando una jeringa Hamilton y una aguja de calibre 30. Luego se aplicó un hisopo a la herida de punción para detener cualquier sangrado antes de la sutura. Se permitió que los ratones se recuperaran de la anestesia en una jaula estéril y se monitorizaron de cerca durante 2-4 horas antes de regresar a la vivienda convencional. Aproximadamente tres semanas después de la implantación del tumor, los ratones fueron asignados de manera aleatoria en grupos de tratamiento. Los ratones (n = 7 por grupo) recibieron: (1) la formulación lipídica de amino-amina o amino-amida de ARNbc; (2) formulación de ARNbc sin el lípido catiónico de amino-amina o amino-amida; o (3) control del vehículo, como se administra mediante inyección intravenosa estándar (i.v.) a través de la vena lateral de la cola. La dosis se calculó con base en mg de ARNbc /kg de peso corporal de acuerdo con los pesos individuales de los animales.

Para los experimentos que generaron los resultados mostrados en la Figura 13, los animales se dosificaron a 5 mg/kg de ARNsiD con partículas lipídicas formuladas con L-6- o L-30. La Tabla 8 presenta composiciones específicas de formulaciones lipídicas que comprenden los lípidos L-6 y L-30 utilizados en los estudios instantáneos.

Tabla 8

Formulaciones	Agentes de unión a ARN		Lípidos de transfección			
	L-6 (Ref.)	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-6 (21.6%)	PEG-DSPE (2.8%)	DSPC (13.8%)
L-30 (de acuerdo con la invención)	DODMA (25.9%)	PEG-DMPE (2.9%)	L-30 (21.6%)	PEG-DSPE (2.8%)	DSPC (13.8%)	Colesterol (33.0%)

Los pesos corporales se monitorizaron durante la duración del estudio como un indicador del desarrollo de la carga tumoral y la tolerabilidad del tratamiento. Para los estudios de eficacia, los puntos finales humanos definidos se determinaron como un sustituto de la supervivencia. Las evaluaciones se realizaron con base en una combinación de signos clínicos, pérdida de peso y distensión abdominal para definir el día de la eutanasia debido a la carga tumoral. Se extrajeron tejidos tumorales de los animales de diferentes grupos de tratamiento y se confirmó la anulación de genes.

Como se muestra en la Figura 13, tanto las formulaciones L-6 como las L-30 probadas fueron notablemente efectivas en la administración de una carga útil formulada de ARNsiD anti-HPRT1 tanto a los tejidos tumorales hepáticos como ortotópicos de Hep3B. Específicamente, se observó una anulación de más del 50% (y en ciertos casos, una anulación del 60-80%) del ARNm diana de HPRT1 tanto en los tejidos tumorales hepáticos como ortotópicos de Hep3B, en comparación con un control PBS. Por consiguiente, cualquiera de los lípidos, o formulaciones de los mismos, sería útil para reducir la expresión de un gen diana (por ejemplo, un gen diana asociado con cáncer).

Ejemplo 11: Uso de una formulación lipídica con ARNbc para reducir la expresión de un gen diana en el modelo de tumor hepático ortotópico HepG2

Con el fin de evaluar la eficiencia de la focalización y la funcionalidad subsecuente de una formulación de lípidos catiónicos de amino-amina o amino-amida de ARNbc, se utilizó un segundo modelo de tumor intrahepático. Los tumores hepáticos se establecieron en ratones mediante inyección intrahepática directa de células tumorales HepG2. Se usaron ratones nu/nu hembra como huéspedes para los tumores HepG2. Manteniendo a los ratones bajo anestesia usando Avertin (Sigma), se realizó una única incisión de 1 cm a través de la línea media debajo del esternón, y el lóbulo hepático lateral izquierdo se exteriorizó. Aproximadamente 3×10^6 células HepG2 suspendidas en 60 μ l de PBS al 50%/Matrigel™ (BD) al 50% se inyectan lentamente en el lóbulo en un ángulo poco profundo utilizando una jeringa Hamilton y una aguja de calibre 30. Luego se aplicó un hisopo a la herida de punción para detener cualquier sangrado antes de la sutura. Se permitió que los ratones se recuperaran de la anestesia en una jaula estéril y se monitorizaron de cerca durante 2-4 horas antes de regresar a la vivienda convencional. Aproximadamente tres semanas después de la implantación del tumor, los ratones se asignaron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. Los ratones (n = 6-7 por grupo) recibieron: (1) la formulación de lípidos de amino-amina o amino-amida de ARNbc; (2) formulación de ARNbc sin el lípido catiónico de amino-amina o amino-amida; o (3) control del vehículo, como se administra mediante inyección intravenosa estándar (i.v.) a través de la vena lateral de la cola. La dosis se calculó con base en mg de ARNbc/kg de peso corporal de acuerdo con los pesos individuales de los animales. Los experimentos que generaron los resultados mostrados en la Figura 14 se dosificaron a 5 mg/kg de ARNsiD en partículas lipídicas formulados con L-6- o L-30. La Tabla 8 presenta composiciones específicas de formulaciones lipídicas que comprenden los lípidos L-6 y L-30 empleados en los estudios instantáneos. Los pesos corporales se monitorizaron durante la duración del estudio como un indicador del desarrollo de la carga tumoral y la tolerabilidad del tratamiento. Para los estudios de eficacia, los puntos finales humanos definidos se determinaron como un sustituto de la supervivencia. Las evaluaciones se realizaron con base en una combinación de signos clínicos, pérdida de peso y distensión abdominal para definir el día de la eutanasia debido a la carga tumoral. Se extrajeron tejidos tumorales de los animales de diferentes grupos de tratamiento y se confirmó la anulación de genes.

Como se muestra en la Figura 14, tanto las formulaciones L-6 como las L-30 probadas fueron notablemente efectivas en el suministro de una carga útil de ARNsiD anti-HPRT1 formulada a los tejidos del hígado. Mientras tanto, se observaron niveles de 20-50% de anulación de ARNm diana de HPRT1 para ambas formulaciones en tejidos tumorales ortotópicos de HepG2. Los resultados anteriores identificaron las formulaciones L-6 y L-30 examinadas aquí como vehículos de suministro de ARNbc efectivos, para el suministro al hígado normal y al menos a ciertos tejidos tumorales (por ejemplo, tumor ortotópico Hep3B y, en menor medida, tumor ortotópico HepG2). Por consiguiente, cualquiera de los lípidos, o formulaciones de los mismos, sería útil para reducir la expresión de un gen diana (por ejemplo, un gen diana asociado con cáncer).

La funcionalidad de la formulación lipídica de ARNbc para la absorción de células tumorales también se puede probar marcando el lípido y/o ARNbc con etiquetas fluorescentes y realizando estudios de biodistribución fluorescente utilizando un sistema de imágenes de animales vivos (Xenogen o BioRad) (Eguchi et al., Nat Biotechnol. 27: 567, 2009). Usando esta metodología, y comparando con la formulación de ARNbc solo, se confirma la capacidad del lípido catiónico de amino-amina o amino-amida para facilitar la internalización de células tumorales para ARNbc. Por el contrario, la formulación de ARNbc sola, utilizada como control en este estudio, no puede ser absorbida y administrada en la misma medida a la superficie del tumor. Los puntos finales de eficacia, la expresión de ARN y los datos de biodistribución se presentan como una comparación entre los tratamientos de la formulación lipídica de ARNbc versus la formulación ARNbc sin el lípido catiónico de amino-amina o amino-amida.

Ejemplo 12: Eficacia antitumoral del carcinoma hepatocelular con formulaciones lipídicas

Los tumores de hígado se establecieron en ratones mediante inyección intrahepática directa de células tumorales Hep3B como se describe en el Ejemplo 10. Aproximadamente dos semanas después de la implantación del tumor, los ratones se asignaron de manera aleatoria en grupos de tratamiento. Los ratones (n = 6 por grupo) recibieron: (1) la formulación de lípidos de amino-amina o amino-amida de un ARNbc de control; (2) la formulación lipídica de amino-amina o amino-amida de un ARNbc activo; o (3) control del vehículo, como se administra mediante inyección intravenosa estándar (i.v.) a través de la vena lateral de la cola. La dosis se calculó con base en mg de ARNbc/kg de peso corporal de acuerdo con los pesos individuales de los animales. En los experimentos que generaron los resultados mostrados en las Figuras 15 y 16, los animales se dosificaron a 5 mg/kg de ARNsiD con partículas lipídicas formuladas con L-6- o L-30. La Tabla 8 anterior presenta composiciones específicas de formulaciones lipídicas que comprenden los lípidos L-6 y L-30 utilizados en los estudios instantáneos.

Los pesos corporales se monitorizaron durante la duración del estudio como un indicador del desarrollo de la carga tumoral y la tolerabilidad del tratamiento. Para los estudios de eficacia, los puntos finales humanos definidos se determinaron como un sustituto de la supervivencia. Las evaluaciones se realizaron con base en una combinación de signos clínicos, pérdida de peso y distensión abdominal para definir el día de la eutanasia debido a la carga tumoral. Se extrajeron tejidos tumorales de los animales de diferentes grupos de tratamiento y se midieron los pesos de los tumores para determinar la eficacia de diferentes grupos de tratamiento. Los niveles séricos de α -fetoproteína (AFP) también se midieron como un biomarcador para la carga tumoral.

Tanto las formulaciones L-6 como L-30 con una carga útil activa fueron notablemente efectivas para reducir la AFP sérica (Figura 15) y el peso del tumor (Figura 16), en comparación con las formulaciones L-6 y L-30 con una carga útil de control y un Control de PBS.

Ejemplo 13: Uso de diferentes formulaciones de lípidos L-30 (de acuerdo con la invención) con ARNbc para reducir la expresión de varios genes diana en modelos de cáncer de hígado ortotópico múltiple

Con el fin de evaluar si la anulación de HPRT1 en el tumor en relación con el hígado se puede ajustar con diferentes formulaciones de L-30, se ajustó el contenido de lípidos de PEG. La Tabla 9 proporciona composiciones específicas de formulaciones de lípidos que comprenden el lípido L-30 usado en los estudios instantáneos. Los experimentos que generaron los resultados mostrados en la Figura 18 se dosificaron a 1, 3 y 10 mg/kg de ARNsiD en partículas lipídicas formuladas con L-30 [1] y 10 mg/kg de ARNsiD en partículas lipídicas formulados con L-30 [2]. Se puede usar cualquier solvente o sistema de solvente útil para introducir los agentes de unión a ARN y el ARNsiD en la formulación, incluidos los solventes y los sistemas de solventes (por ejemplo, solventes acuosos y/o no acuosos) que son iguales o diferentes que eso para la transfección de lípidos.

Como se muestra en la Figura 18, ambas formulaciones L-30 [1] y L-30 [2] fueron efectivas en la administración de una carga útil de ARNsiD anti-HPRT1 formulada a los tejidos hepáticos y en los tejidos tumorales ortotópicos Hep3B. Mientras tanto, la anulación del hígado se reduce significativamente sin afectar negativamente la anulación del tumor en las formulaciones L-30 [2] en comparación con las formulaciones L-30 [1] con 10 mg/kg de ARNsiD. Estos resultados indican que aumentar el contenido de lípidos de PEG en las formulaciones de lípidos puede afectar el suministro de las partículas lipídicas y, posteriormente, la anulación de un gen diana a ciertos tejidos.

La efectividad de la formulación L-30 [1] como vehículo de administración de ARNbc se probó en diversos modelos de cáncer de hígado ortotópico y con diferentes ARNbc. La Figura 19 muestra los resultados generados a partir de experimentos con diferentes modelos de cáncer de hígado que muestran que L-30 [1] fue eficaz en el suministro de una carga útil formulada de ARNsiD anti-HPRT1 a todos los modelos de cáncer probados en comparación con el control. La Figura 20 muestra los resultados generados a partir de experimentos usando formulaciones L-30 [1] que contienen múltiples ARNsiDs independientes y anulación de genes correspondientes en un modelo de tumor ortotópico Hep3B HCC. Por consiguiente, cualquiera de los lípidos descritos en el presente documento puede usarse para reemplazar L-30 en las composiciones específicas de formulaciones lipídicas en la Tabla 9 y cualquier ARNbc puede usarse para reducir la expresión de un gen diana (por ejemplo, un gen diana asociado con cáncer o una enfermedad descrita aquí).

Tabla 9

	Lípidos	L-30 [1] ²	L-30 [2] ²
Agentes de unión a ARN	DODMA	25.9	25.9
	PEG ₂₀₀₀ -DMPE	2.9	2.9
Lípidos de transfección	L-30	21.6	21.6
	DSPC	13.8	13.8
	Colesterol	33.0	28.8
	PEG ₂₀₀₀ -DSPE	2.8	7.0
Mezcla		Lote	Lote
% de Etanol ¹		4%	4%
Regulador LNP		Solución salina	Solución salina
¹ Antes de la purificación; ² Porcentaje en moles de lípidos			

Ejemplo 14: Uso de diferentes formulaciones de lípidos L-30 (de acuerdo con la invención) con ARNbc para reducir la expresión de un gen diana en tejidos tumorales de Hep3B HCC

Con el fin de evaluar la eficiencia del direccionamiento y la funcionalidad subsecuente de la formulación L-30 de ARNbc, se probaron formulaciones L-30 que varían en porcentajes molares de lípidos. La Tabla 10 proporciona composiciones específicas de formulaciones lipídicas que comprenden L-30 como lípido de transfección. En particular, las formulaciones L-30 [E] y L-30 [G] contienen L-48 como agente de unión a ARN en lugar de DODMA. L-48

comprende un grupo de cabeza H-5 y grupos de cola de dioleilo (Figura 17). Se puede usar cualquier solvente o sistema de solvente útil para introducir los agentes de unión a ARN y el ARNsiD en la formulación, incluidos los solventes y los sistemas de solventes (por ejemplo, solventes acuosos y/o no acuosos) que son iguales o diferentes que eso para los lípidos de transfección.

- 5 Los resultados de la anulación de hHPRT1 en tejidos tumorales Hep3B HCC se muestran en la Figura 21. Todas las formulaciones de L-30 (es decir, [A] a [G]) dieron como resultado una disminución en la expresión de hHPRT1 en tejidos tumorales en comparación con el control de PBS. En particular, L-30 [A] proporcionó la mayor disminución en la expresión de hHPRT1 seguido de L-30 [D], L-30 [G] y L-30 [E].

Tabla 10

	Lípidos	L-30 [A] ²	L-30 [B] ²	L-30 [C] ²	L-30 [D] ²	L-30 [E] ²	L-30 [F] ²	L-30 [G] ²
Agentes de unión a ARN	DODM A	25.9	25.9	25.7	25.9	-	25.9	-
	L-48	-	-	-	-	25.9	-	25.9
	PEG ₂₀₀₀ -DMPE	2.9	2.9	2.3	2.9	2.9	2.9	2.9
Transfectoriones lípidos	L-30	21.6	21.0	21.2	21.6	21.6	21.6	21.6
	DSPC	13.8	13.8	14.0	13.8	13.8	13.8	13.8
	Colesterol	33.0	34.0	34.3	33.0	33.0	33.0	33.0
	PEG ₂₀₀₀ -DSPE	2.8	2.4	2.4	2.8	2.8	2.8	2.8
Mezcla		Lote	Lote	Lote	Lote	Lote	En línea	Lote
% de Etanol ¹		4%	4%	4%	4%	4%	4% ³	4%
Regulador LNP		PBS	PBS	PBS	Solución salina	PBS	PBS	Solución salina
¹ Antes de la purificación; ² Porcentaje en moles de lípidos ³ La misma formulación con 8% de etanol también se preparó con éxito								

10

Ejemplo 15: Uso de diferentes formulaciones de lípidos L-6 (Ref.) y L-30 con ARNbc para reducir la expresión de un gen diana en tejidos tumorales de pulmón y próstata

- 15 Con el fin de evaluar la eficiencia del direccionamiento y la funcionalidad subsecuente de diferentes formulaciones de L-6 y L-30, se analizó la anulación de ARNm de HPRT1 en diversos tejidos tumorales. Las tablas 9, 10 y 11 proporcionan composiciones específicas de formulaciones lipídicas que comprenden los lípidos L-6 y L-30 utilizados en los estudios instantáneos. Se puede usar cualquier solvente o sistema solvente útil para introducir los agentes de unión a ARN y la carga útil de ácidos nucleicos (por ejemplo, ARNsiD) en la formulación, incluidos los solventes y los sistemas de solventes (por ejemplo, solventes acuosos y/o no acuosos) que son iguales o diferentes a los de los lípidos de transfección.

- 20 Los experimentos que generaron la Figura 22 se dosificaron a 10 mg/kg de ARNsiD en partículas lipídicas formuladas con L-6 [2] y L-30 [2] y se administraron los días 1 y 3 del experimento. Los tumores se recolectaron el día 5. La anulación de ARNm de hHPRT1 se midió en tejidos de tumor de pulmón de NSCLC H1975. Se observó un mayor nivel de anulación de ARNm diana de HPRT1 para la formulación L-30 [2] en comparación con la formulación L-6 [2].

Los experimentos que generaron la Figura 23 se dosificaron a 10 mg/kg de ARNsiD en partículas lipídicas formulados con L-6 [2] y L30 [3] y se administraron los días 1 y 3 del experimento. Los tumores se recolectaron el día 5. La anulación de ARNm de hHPRT1 se midió en tejidos de tumor de xenoinjerto SC de cáncer de próstata 22Rv1. Se observó un mayor nivel de anulación de ARNm diana de HPRT1 para la formulación L-30 [3] en comparación con la formulación L-6 [2]. Los resultados de la anulación de hHPRT1 en el cáncer de próstata 22Rv1 implantado en el hígado se muestran en la Figura 24. Los experimentos se establecieron de manera similar a los experimentos realizados en la Figura 23. En los experimentos particulares de la Figura 24, se observó un mayor nivel de anulación de ARNm diana de HPRT1 para la formulación L-6 [1] en comparación con las formulaciones L-30 [A] y L-30 [E]. En consecuencia, cualquiera de los lípidos descritos aquí puede usarse para reemplazar L-6 o L-30 en las composiciones específicas de las formulaciones de lípidos en la Tabla 9 y cualquier ARNbc puede usarse para reducir la expresión de un gen diana asociado con cáncer (por ejemplo, cualquier cáncer descrito aquí).

Tabla 11

	Lípidos	L-6 [1] ²	L-6 [2] ²	L-30 [3] ²
Agentes de unión a ARN	DODMA	25.9	25.9	25.9
	PEG ₂₀₀₀ -DMPE	2.9	2.9	2.9
Lípidos de transfección	L-6/L-30	21.6	21.6	21.6
	DSPC	13.8	13.8	13.8
	Colesterol	33.0	28.8	28.8
	PEG ₂₀₀₀ -DSPE	2.8	7.0	7.0
Mezcla		Lote	Lote	Lote
% de Etanol ¹		4%	4%	4%
Regulador LNP		PBS	PBS	PBS
¹ Antes de la purificación;				
² Porcentaje en moles de lípidos				

Ejemplo 16: formulación de lípidos que contiene L-30 con ARNbc (de acuerdo con la invención)

La Tabla 12 proporciona componentes específicos de una formulación lipídica que comprende L-30 como el lípido de transfección. Se puede usar cualquier solvente o sistema de solvente útil para introducir los agentes de unión a ARN y el ARNsiD en la formulación, incluidos los solventes y los sistemas de solventes (por ejemplo, solventes acuosos y/o no acuosos) que son iguales o diferentes que eso para los lípidos de transfección. Además, cualquiera de los lípidos descritos aquí puede usarse para reemplazar L-30 como el lípido de transfección en la Tabla 12 (por ejemplo, cualquiera de los descritos aquí, tal como en la Tabla 1) y cualquier ARNbc puede usarse para reducir la expresión de un gen diana (por ejemplo, un gen diana asociado con cáncer o una enfermedad descrita en el presente documento).

Tabla 12

	Componente	MW (g/mol)	Cantidad (mg)	Cantidad (mmol)	% en moles
Agentes de unión a ARN	ARNsiD	17000	1.00	0.00006	-
	DODMA	620.09	4.43	0.0071	25.9
	PEG-DMPE	2693.3	2.12	0.0008	2.9

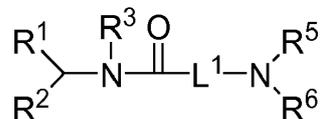
ES 2 745 373 T3

	Componente	MW (g/mol)	Cantidad (mg)	Cantidad (mmol)	% en moles
	Total		6.55	0.0079	28.7
Lípidos de transfección	L-30	613.05	3.65	0.0060	21.6
	PEG-DSPE	2805.5	2.14	0.0008	2.8
	DSPC	790.16	3.01	0.0038	13.8
	Colesterol	386.65	3.53	0.0091	33.1
	Total		12.33	0.020	71.3
Lípidos de transfección: ARNsID			12	334	-
Lípidos totales			18.88	0.028	100.0
Lípidos totales: ARNsID			19	469	-
Lípidos catiónicos totales ¹			8.08	0.0131	47.5
Lípidos catiónicos: ARNsID			8	223	-
¹ Combinación de DODMA y L-30					

En la descripción y páginas de dibujos, los ejemplos L30 y L49 son parte del asunto objeto de la presente solicitud.

REIVINDICACIONES

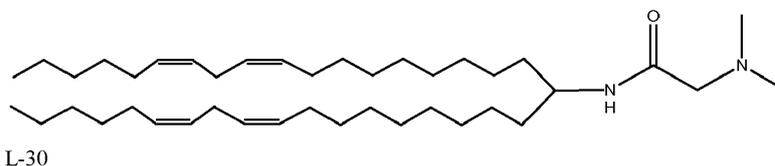
1. Un compuesto que tiene la fórmula:



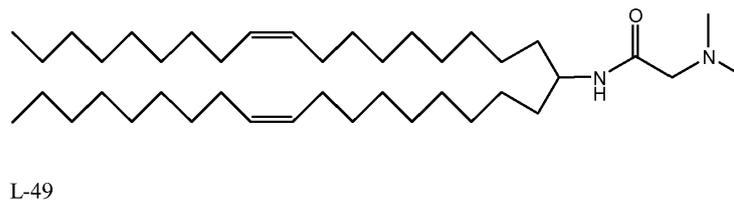
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde

- 5 - cada R¹ y R² es, independientemente, alquilo C₁₁₋₂₄, alqueno C₁₁₋₂₄ o alquinilo C₁₁₋₂₄;
 - L¹ es alqueno C₁;
 - R³ es H;
 - cada R⁵ y R⁶ es alquilo C₁₋₆.

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto tiene una fórmula como sigue:



3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto tiene una fórmula como sigue:



4. Una formulación que comprende un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo,

- 15 en donde, preferiblemente, dicha formulación comprende dos o más de dichos compuestos,
 en donde, preferiblemente, dicha formulación comprende entre 10% y 80% de dicho compuesto,
 en donde, preferiblemente, dicha formulación comprende entre 20% en moles y 25% en moles de dicho compuesto, y más preferiblemente, dicha formulación comprende 22% en moles de dicho compuesto,
 20 en donde dicha formulación, preferiblemente, comprende además un lípido catiónico, un lípido neutro y, opcionalmente, un derivado de esteroides,
 en donde, preferiblemente, dicho lípido catiónico, si está presente, se selecciona del grupo que consiste en N,N-dimetil-(2,3-dioleiloxi)propilamina (DODMA), 1,2-di-O-octadecenil-3-trimetilamonio propano (DOTMA), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-O-etil-3-fosfocolina (DPePC), 1,2-dioleoil-3-dimetilamonio propano (DODAP) y 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP); y
 25 en donde, preferiblemente, dicho lípido neutro, si está presente, se selecciona del grupo que consiste en 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC), 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC), 1,2-dioleoil-glicero-sn-3-fosfoetanolamina (DOPE) y esfingomielina (SM);
 en donde, preferiblemente, dicho lípido catiónico es DODMA y dicho lípido neutro es DSPC;
 en donde dicha formulación, preferiblemente, comprende además un conjugado de PEG-lípido;
 30 en donde, preferiblemente, dicho conjugado de PEG-lípido, si está presente, se selecciona del grupo que consiste en 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-(metoxi-polietilenglicol) (PEG-DMG), 1,2-dimiristoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-polietilenglicol) (PEG-DMPE), 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-polietilenglicol) (PEG-DSPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(carbonil-metoxi-polietilenglicol) (PEG-DPPE), 1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-3-(metoxi-polietilenglicol) (PEG-DPG), 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-

N-(carbonil-metoxi-poli(etilenglicol) (PEG-DOPE) y 1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-(metoxi-poli(etilenglicol) (PEG-DOG), y más preferiblemente dicho conjugado de PEG-lípido es PEG-DMPE o PEG-DSPE,

5 en donde dicho derivado de esteroides, si está presente, se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en colesterol; colestano; colesteno; coprostanol; 3β-[(N-(N',N'-dimetilamino)etano)-carbamoil]colesterol (DC-colesterol); bis-guanidinium-tren-colesterol (BGTC); (2S,3S)-2-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi) carbonilamino) etil 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato (DPC-1); (2S,3S)-((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il) 2,3,4,4-tetrahidroxibutanoato (DPC-2); bis((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il) 2,3,4-trihidroxipentanodioato (DPC-3); y 6-(((3S,10R,13R,17R)-10,13-dimetil-17-((R)-6-metilheptan-2-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-iloxi) oxidofosforiloxi)-2,3,4,5-tetrahidroxihexanoato (DPC-4), y más preferiblemente, dicho derivado de esterol es colesterol,

15 en donde dicha formulación comprende preferiblemente de 10% en moles a 40% en moles de L-30, de 10% en moles a 40% en moles de L-49, de 10% en moles a 40% en moles de uno o más lípidos catiónicos, de 1% en moles a 20% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos, de 5% en moles a 20% en moles de uno o más lípidos neutros, y de 20% en moles a 40% en moles de uno o más derivados de esteroides,

20 más preferiblemente de 20% en moles a 25% en moles de L-30, de 20% en moles a 25% en moles de L-49, de 20% en moles a 30% en moles de uno o más lípidos catiónicos, de 2% en moles a 8 moles % de uno o más conjugados de PEG-lípidos, de 10% en moles a 20% en moles de uno o más lípidos neutros, y de 25% en moles a 35% en moles de uno o más derivados de esteroides, y

más preferiblemente 22% en moles de L-30, más preferiblemente 22% en moles de L-49, 26% en moles de uno o más lípidos catiónicos, 5% en moles a 9% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípido, 14% en moles de uno o más lípidos neutros y 29% en moles a 33% en moles de uno o más derivados de esteroides,

25 en donde dicha formulación, preferiblemente, comprende una o más partículas lipídicas que comprenden uno o más agentes de unión a ARN y uno o más lípidos de transfección, dichos uno o más agentes de unión a ARN, preferiblemente, que comprenden de 10% en moles a 40% en moles de uno o más lípidos catiónicos o uno o más compuestos de L-30 o L-49 y de 0.5% en moles a 10% en moles de uno o más lípidos de PEG; y dicho uno o más lípidos de transfección, preferiblemente, que comprenden de 10% en moles a 40% en moles de uno o más compuestos de L-30 o L-49, de 5% en moles a 20% en moles de uno o más lípidos neutros, de 0.5 % en moles a 10% en moles de uno o más conjugados de PEG-lípidos, y de 20% en moles a 40% en moles de uno o más derivados de esteroides,

en donde dicha formulación, preferiblemente, comprende un liposoma, un lipoplex o una micela,

y en donde dicha formulación, preferiblemente, comprende dicho liposoma, y dicho liposoma es una nanopartícula lipídica.

35 5. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 4, que comprende además una carga útil polianiónica o una carga útil antisentido.

6. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 5, en la que dicha carga útil polianiónica es un agente de iARN.

40 7. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 6, en la que el agente de iARN se selecciona del grupo que consiste en ARN bicatenario (ARNbc), ARN de interferencia corta (ARNip), microARN (miARN), ARN de horquilla corta (ARNhc), ARN de silenciamiento génico postranscripcional (ARNsgps) y ARN de sustrato Dicer (ARNsiD).

8. Una formulación de la reivindicación 6 o la reivindicación 7, en la que el agente de iARN tiene una longitud de 10 a 40 nucleótidos, 25 a 35 nucleótidos, 16 a 30 nucleótidos o 19 a 29 nucleótidos.

9. Una formulación como se reivindica en la reivindicación 7, en la que el agente de iARN es un ARNsiD.

45 10. Una formulación como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en la que la formulación comprende de 1:10 (p/p) a 1:100 (p/p) de la carga útil polianiónica al lípido total presente en la formulación.

11. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o una formulación de cualquiera de las reivindicaciones 5-10; y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

50 12. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10 o una composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso en tratamiento.

13. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10 o una composición farmacéutica de la reivindicación 11, para uso en el tratamiento del cáncer, preferiblemente carcinoma hepatocelular, cáncer de pulmón, cáncer de próstata o neuroblastoma.

5 14. Una composición farmacéutica de la reivindicación 11 para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en la que el tratamiento comprende modular la expresión de un ácido nucleico diana en un sujeto, comprendiendo dicho tratamiento administrar la composición farmacéutica de la reivindicación 11 en una cantidad suficiente para reducir la expresión de dicho gen diana en dicho sujeto,

10 en donde dicho gen diana se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ABL1, AR, β -Catenina, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA1, ERBA2, ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MET, MDM2, MLL1, MLL2, MLL3, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TAL2, TCL3, TCL5, YES, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, WT1, ApoB100, CSN5, CDK6, ITGB1, TGF β 1, Ciclina D1, PLK1 y proteína de unión a KIF1.

15 15. Una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5-10 para uso de acuerdo con la reivindicación 12 o la reivindicación 13, en la que el tratamiento comprende modular la expresión de un ácido nucleico diana en un sujeto, comprendiendo dicho tratamiento administrar una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5-10 en una cantidad suficiente para reducir la expresión de dicho gen diana en dicho sujeto,

20 en donde dicho gen diana se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en ABL1, AR, β -Catenina, BCL1, BCL2, BCL6, CBFA2, CBL, CSF1R, ERBA1, ERBA2, ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ETS1, ETS2, ETV6, FGR, FOS, FYN, HCR, HRAS, JUN, KRAS, LCK, LYN, MET, MDM2, MLL1, MLL2, MLL3, MYB, MYC, MYCL1, MYCN, NRAS, PIM1, PML, RET, SRC, TAL1, TAL2, TCL3, TCL5, YES, BRCA1, BRCA2, MADH4, MCC, NF1, NF2, RB1, TP53, WT1, ApoB100, CSN5, CDK6, ITGB1, TGF β 1, Ciclina D1, PLK1 y proteína de unión a KIF1.

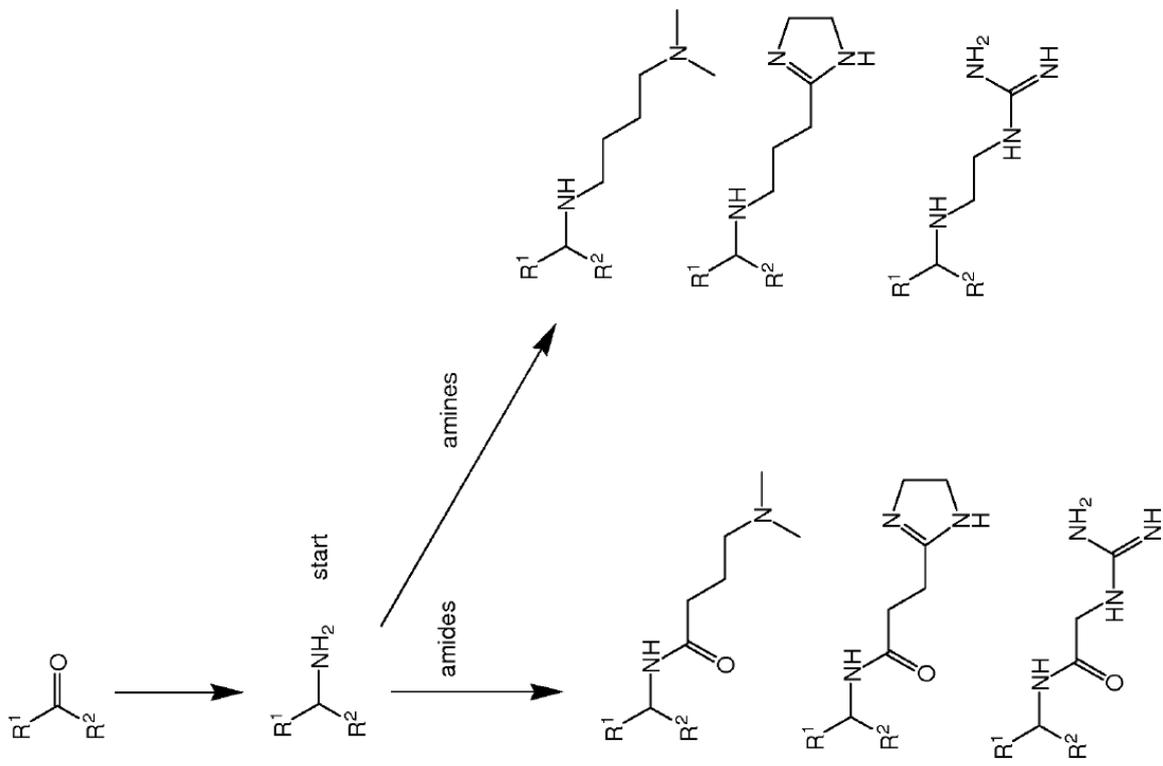


Figure 1

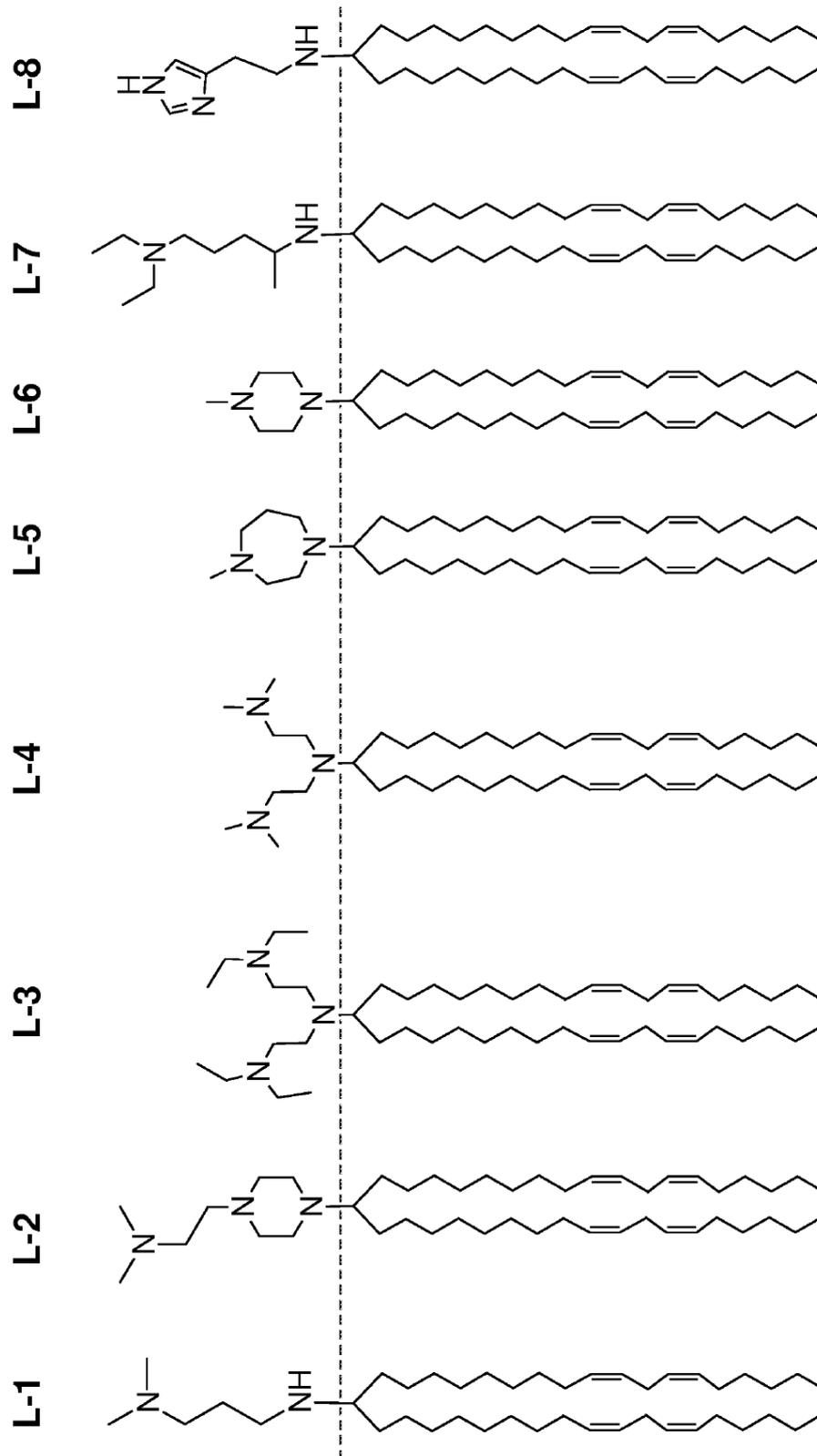


Figure 2A

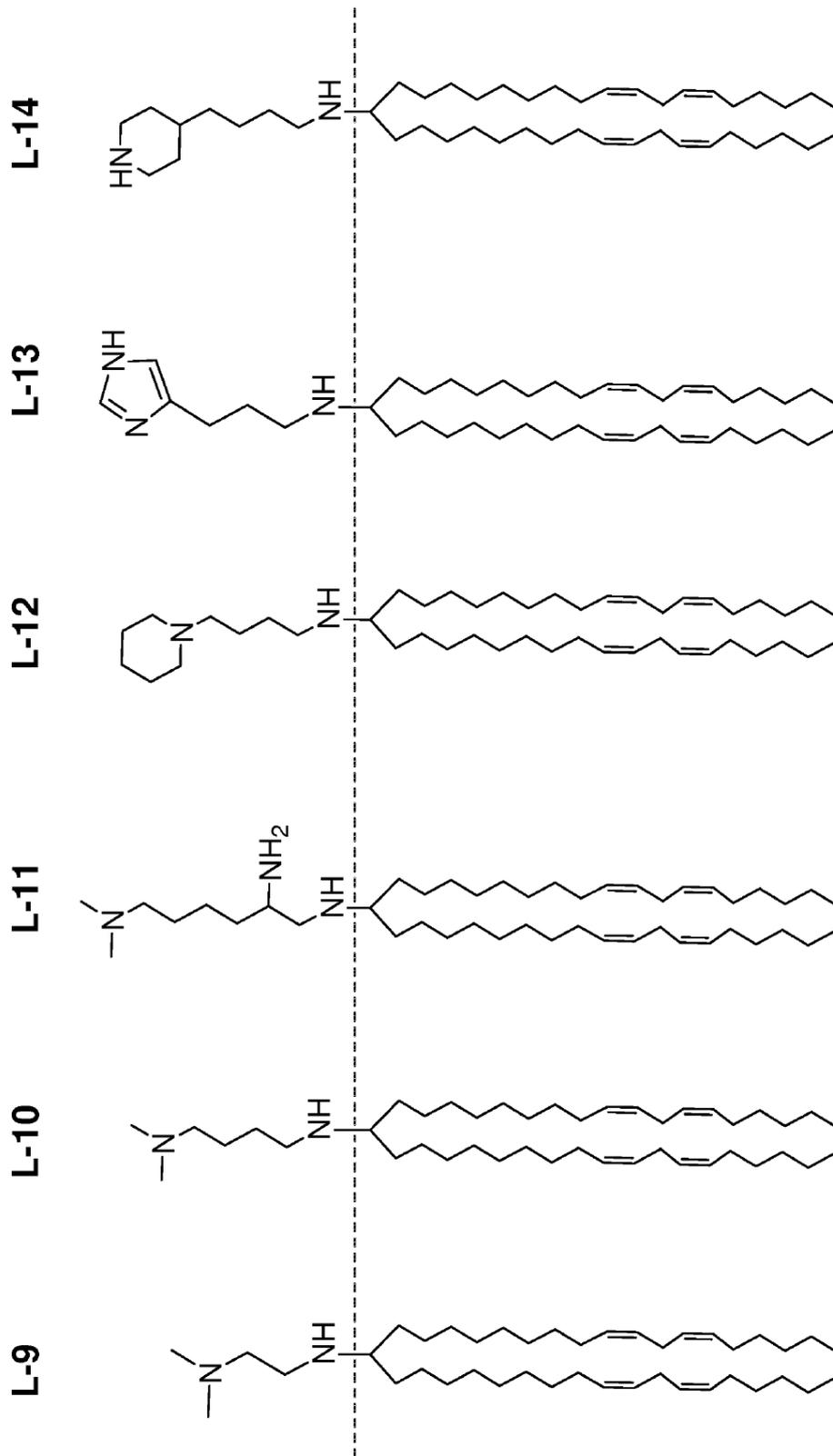


Figura 2B

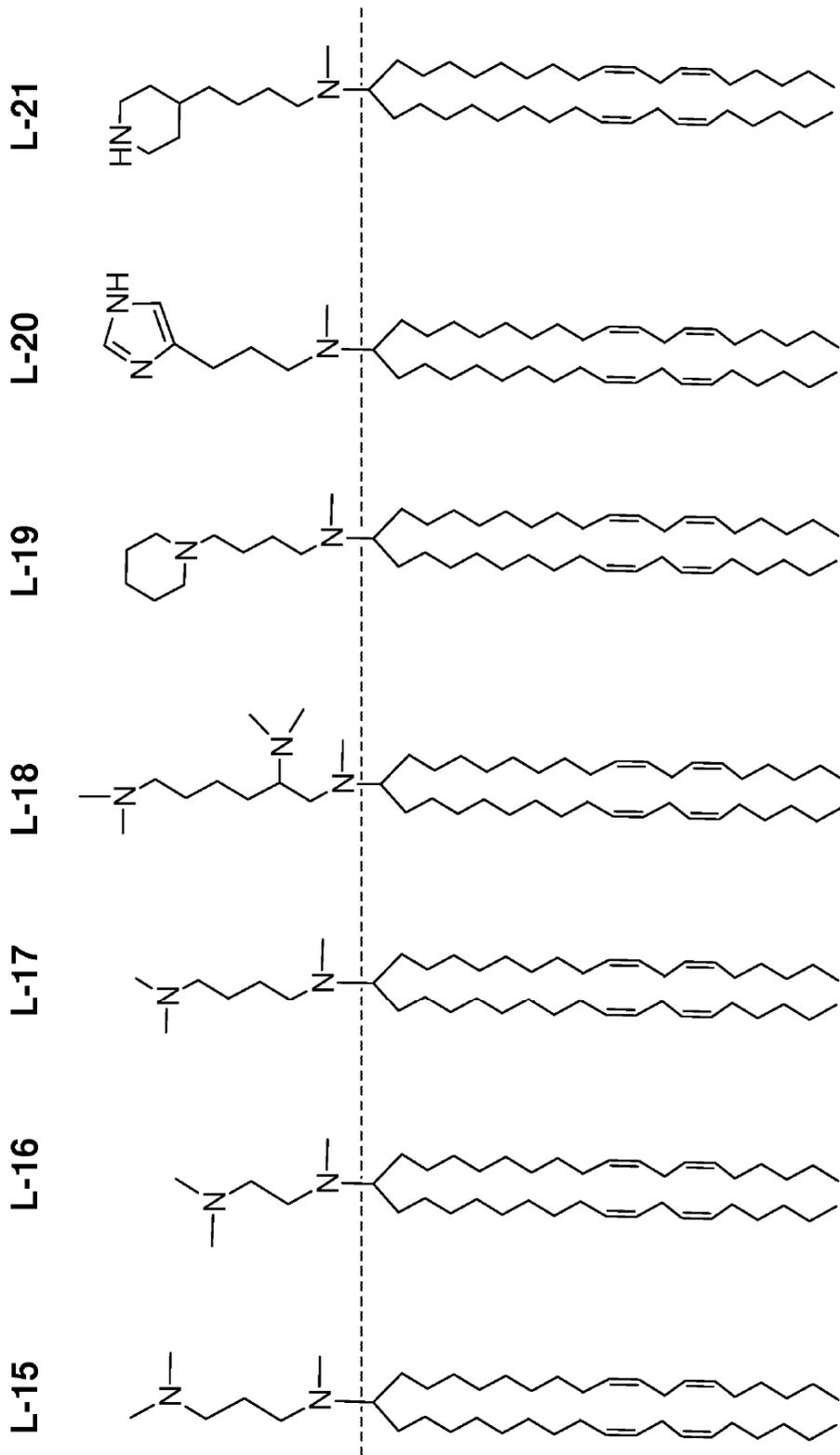


Figura 3

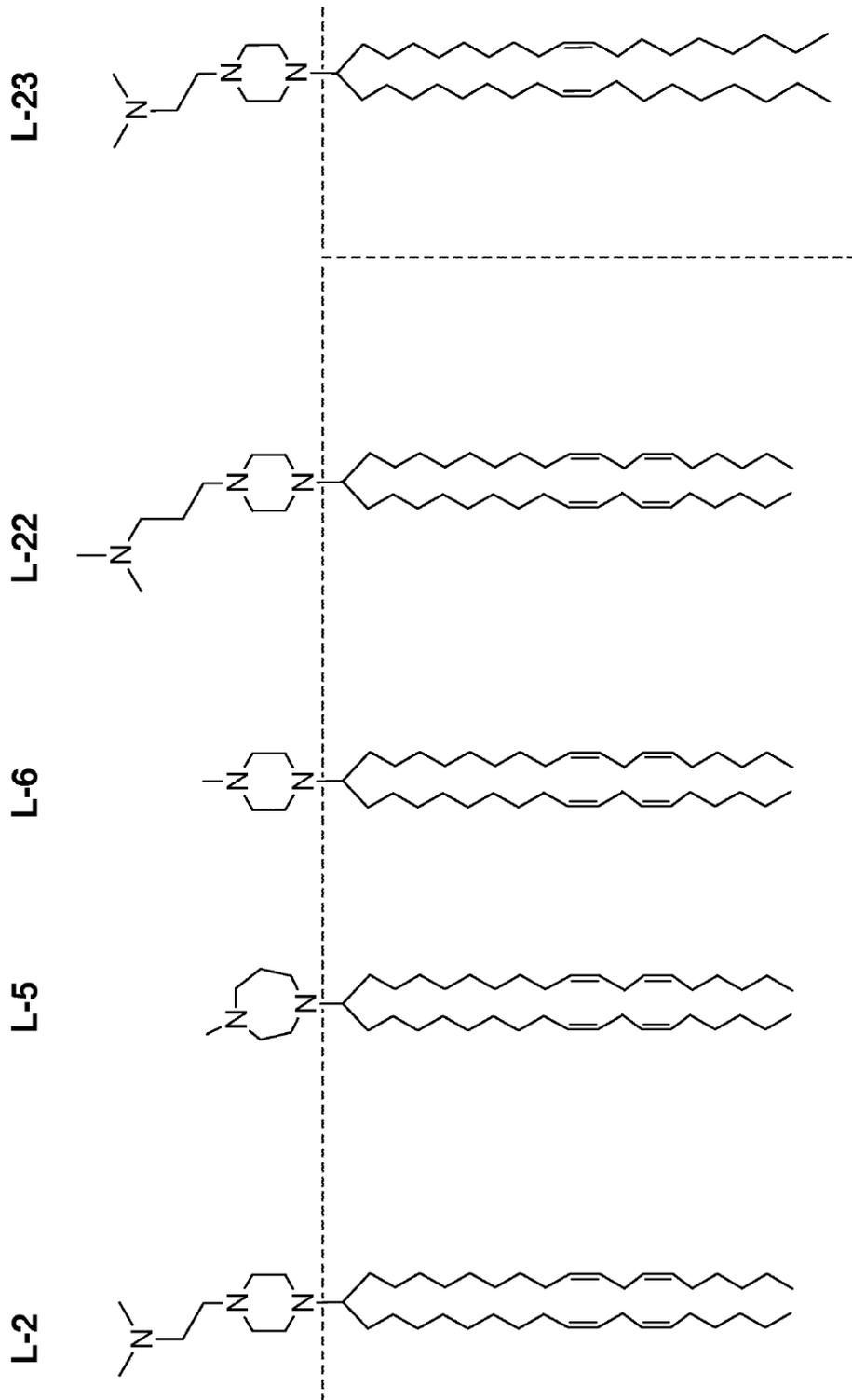


Figura 4

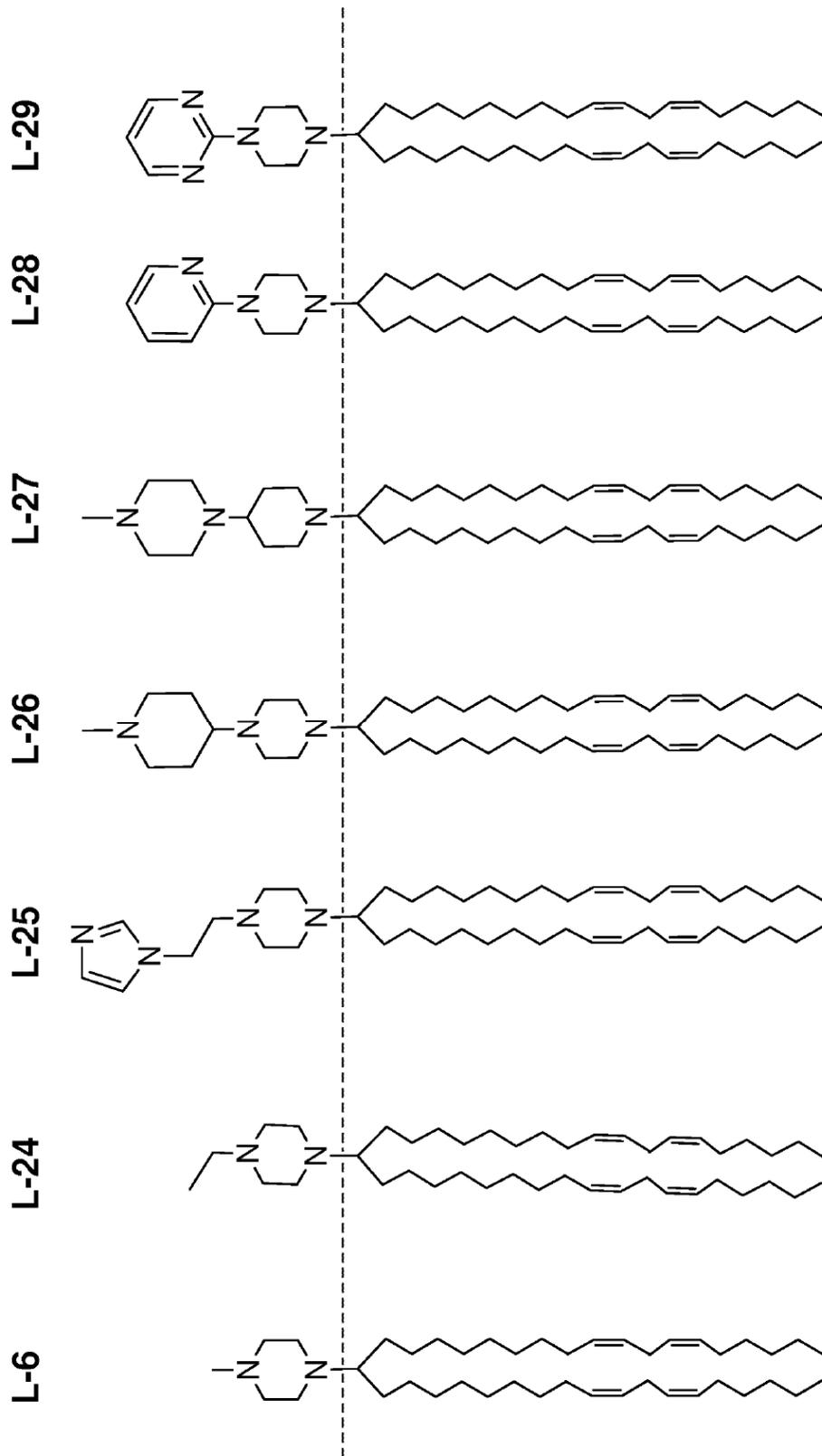


Figura 5

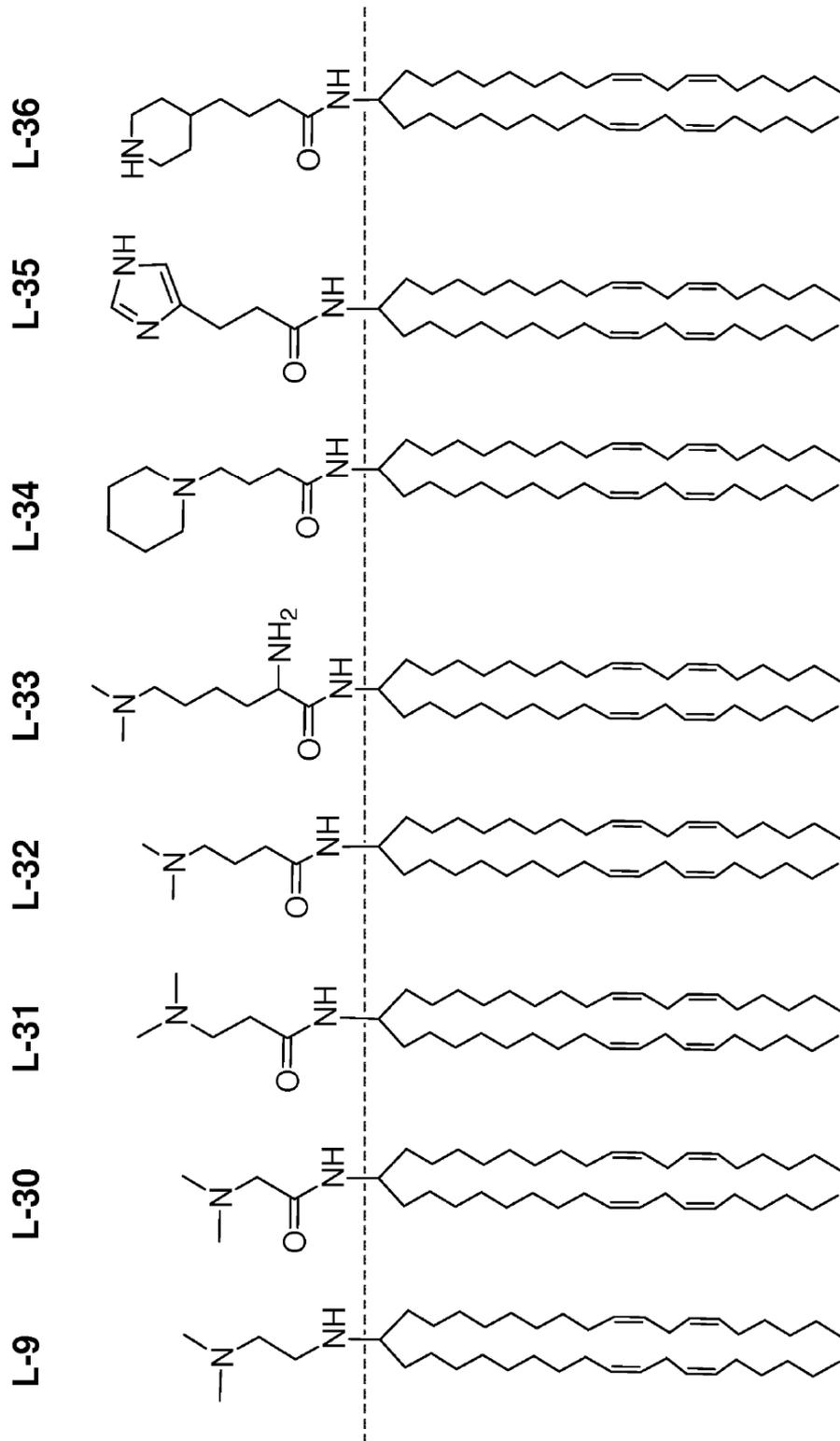


Figura 6

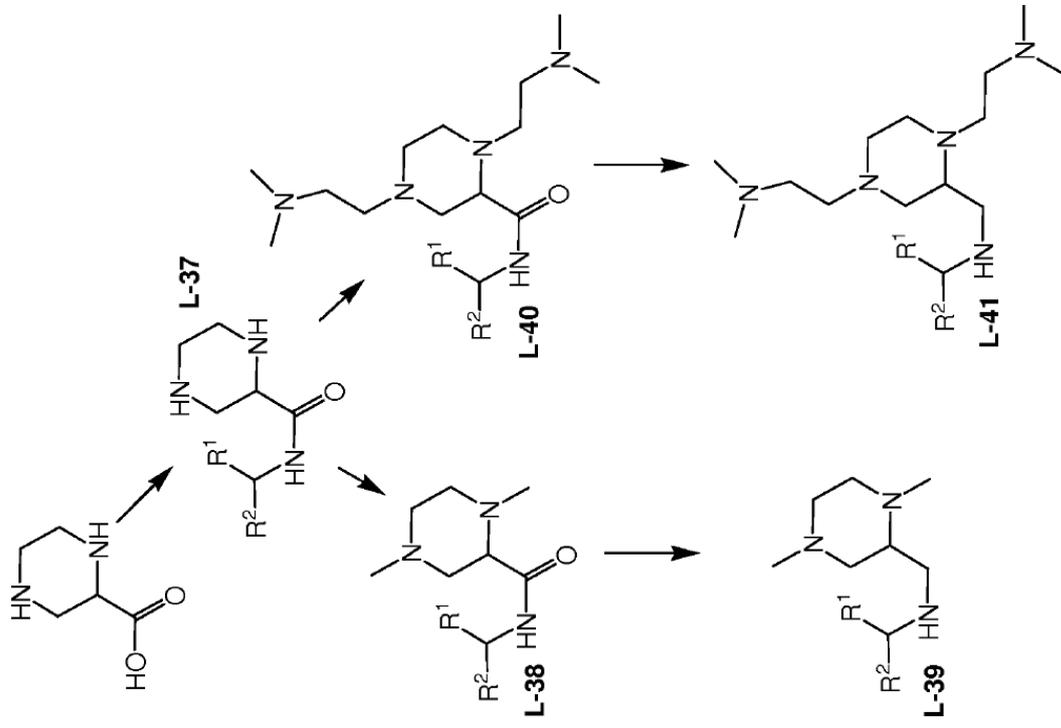
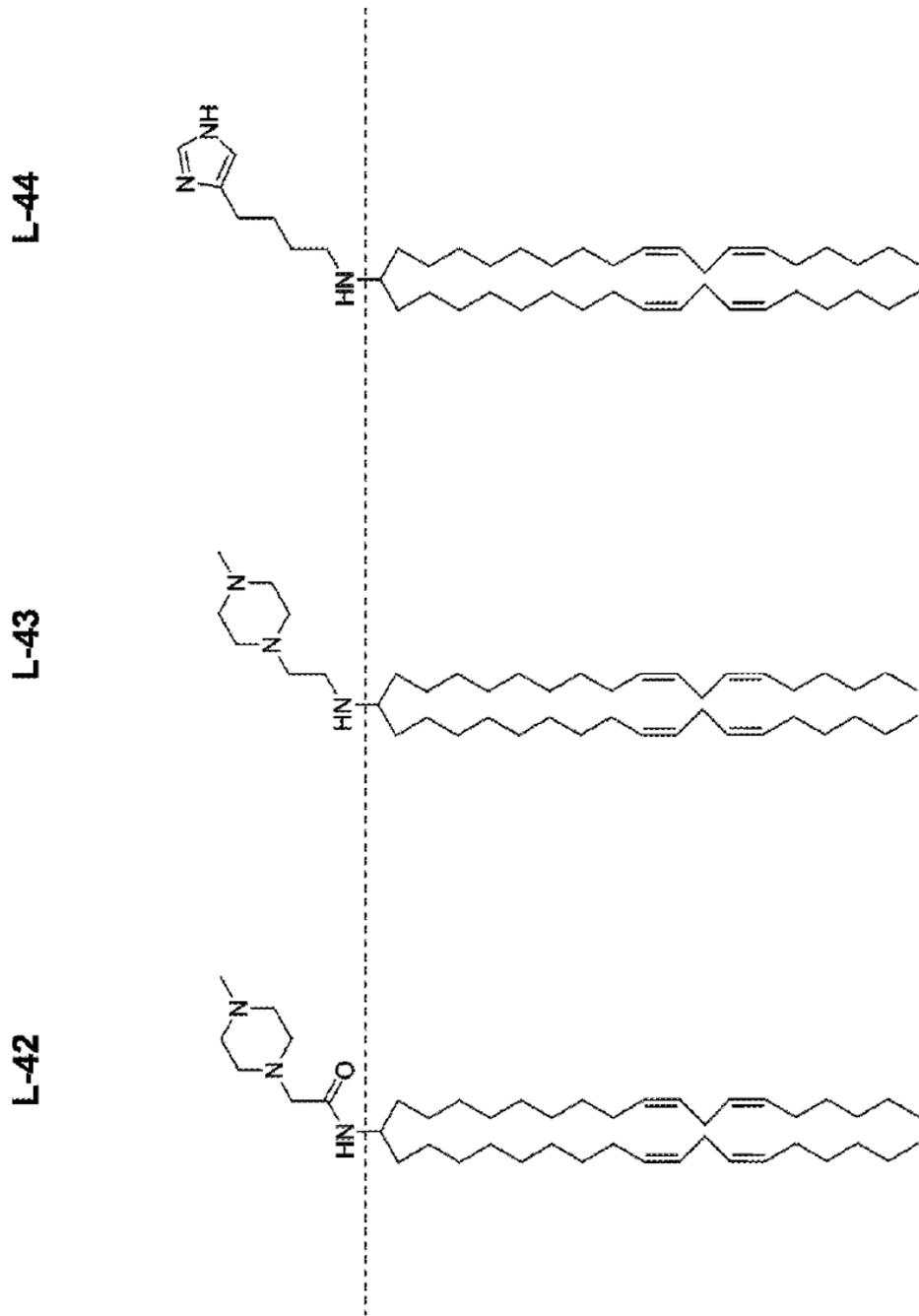


Figura 7



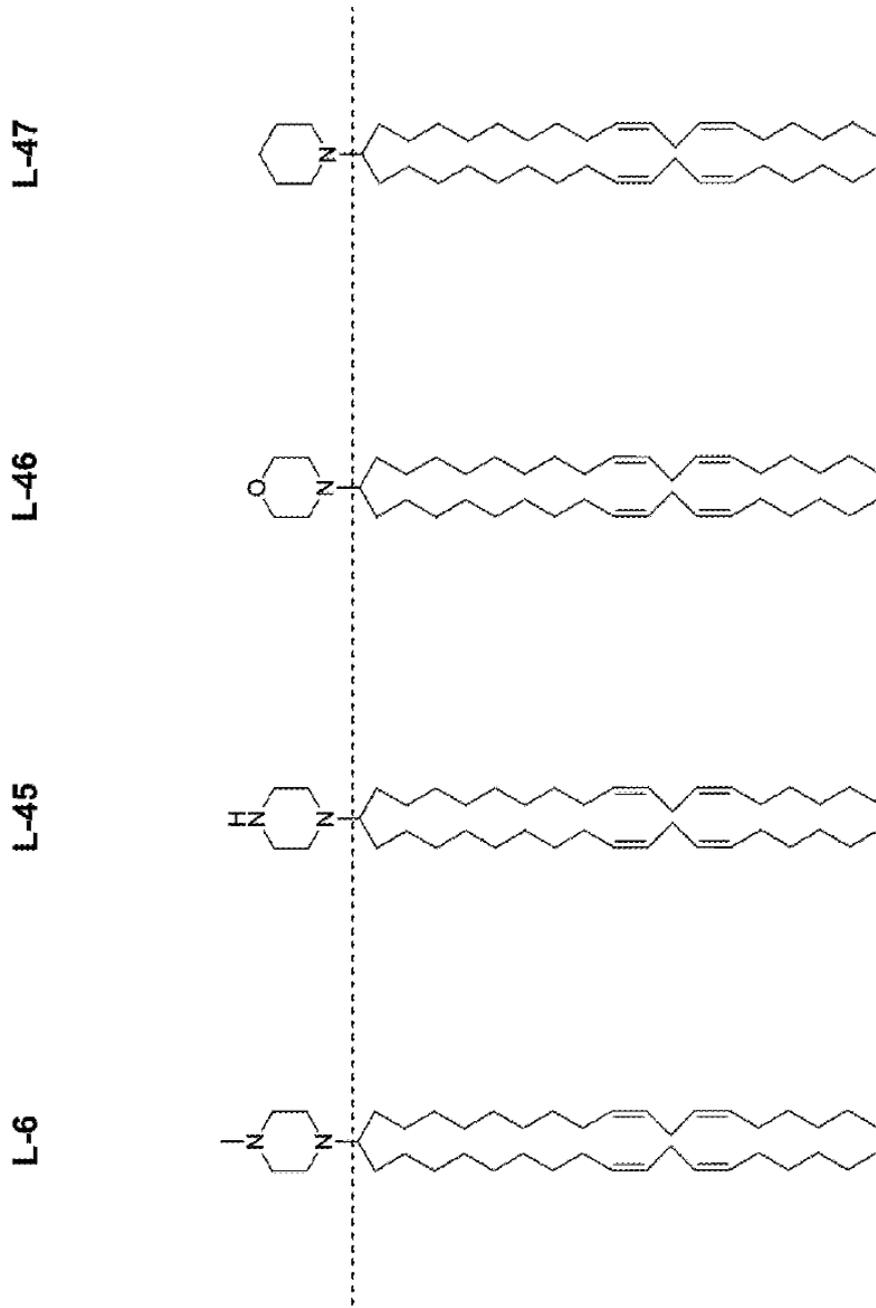


Figura 9

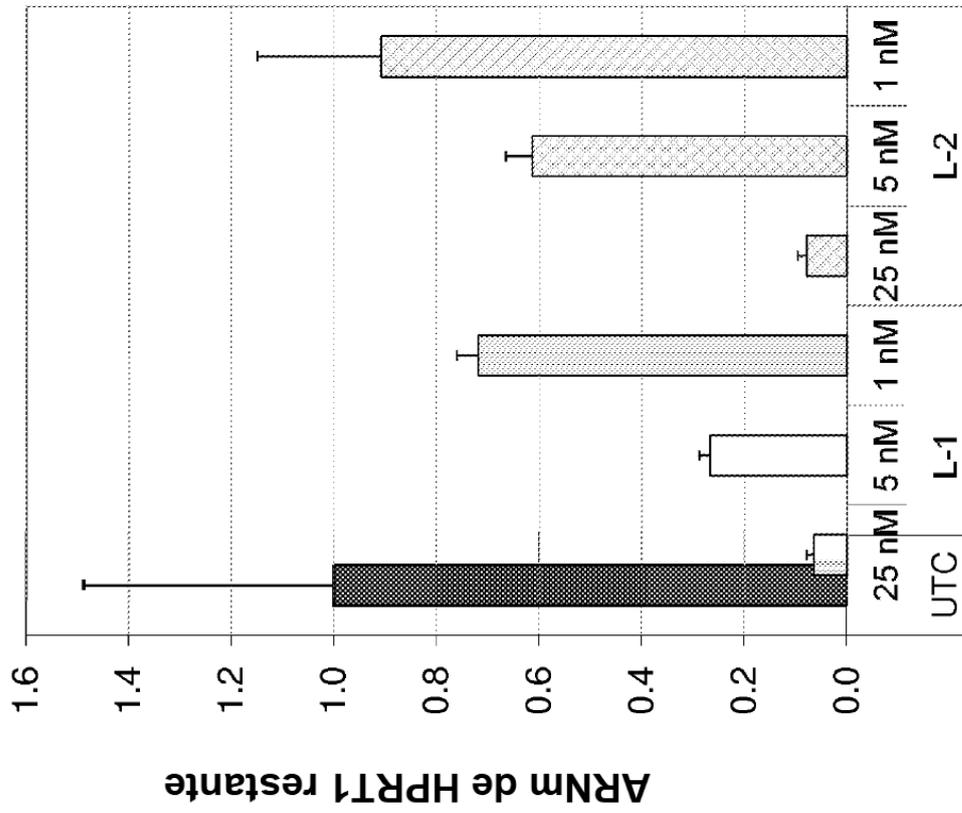


Figura 10

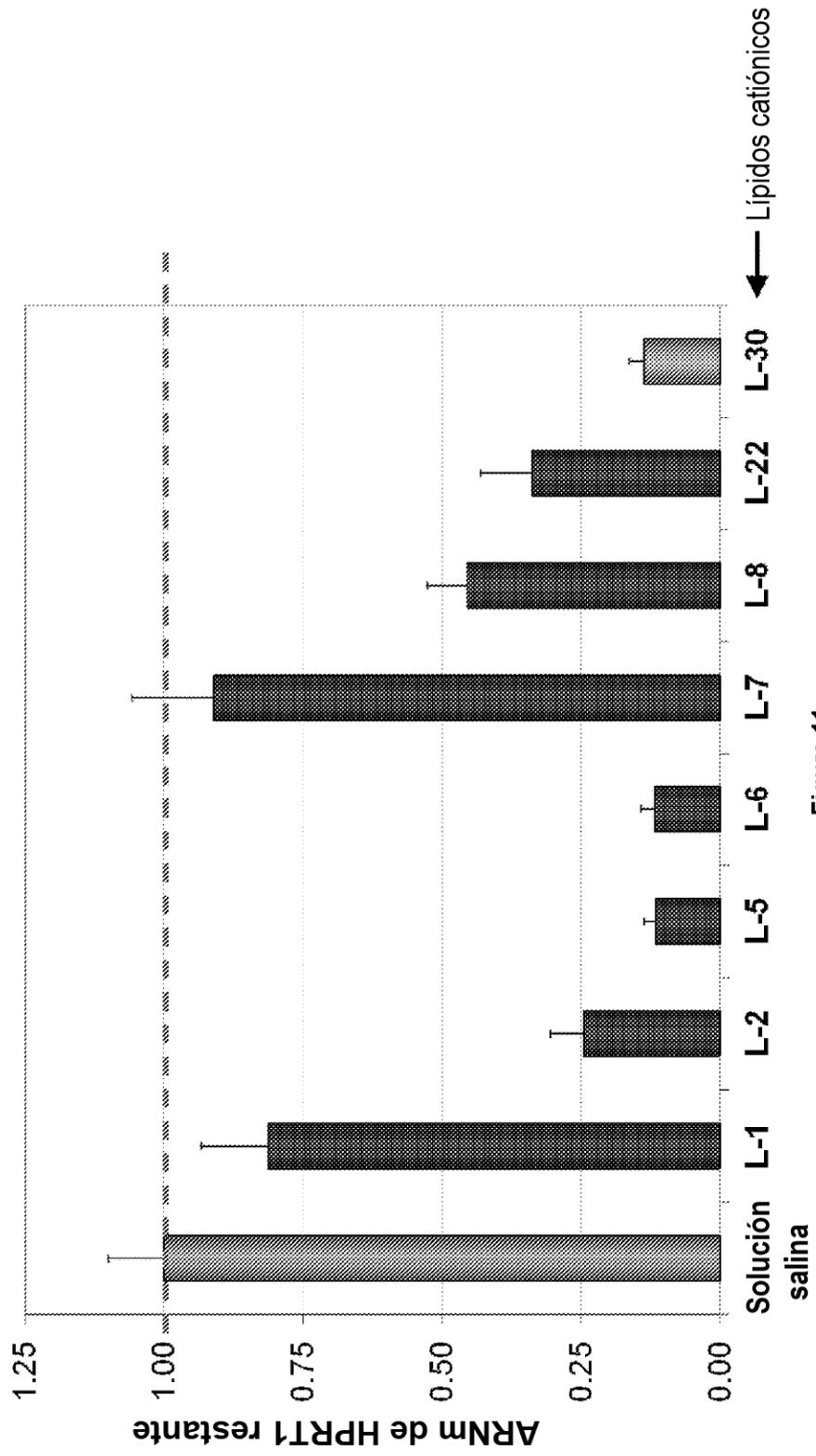


Figura 11

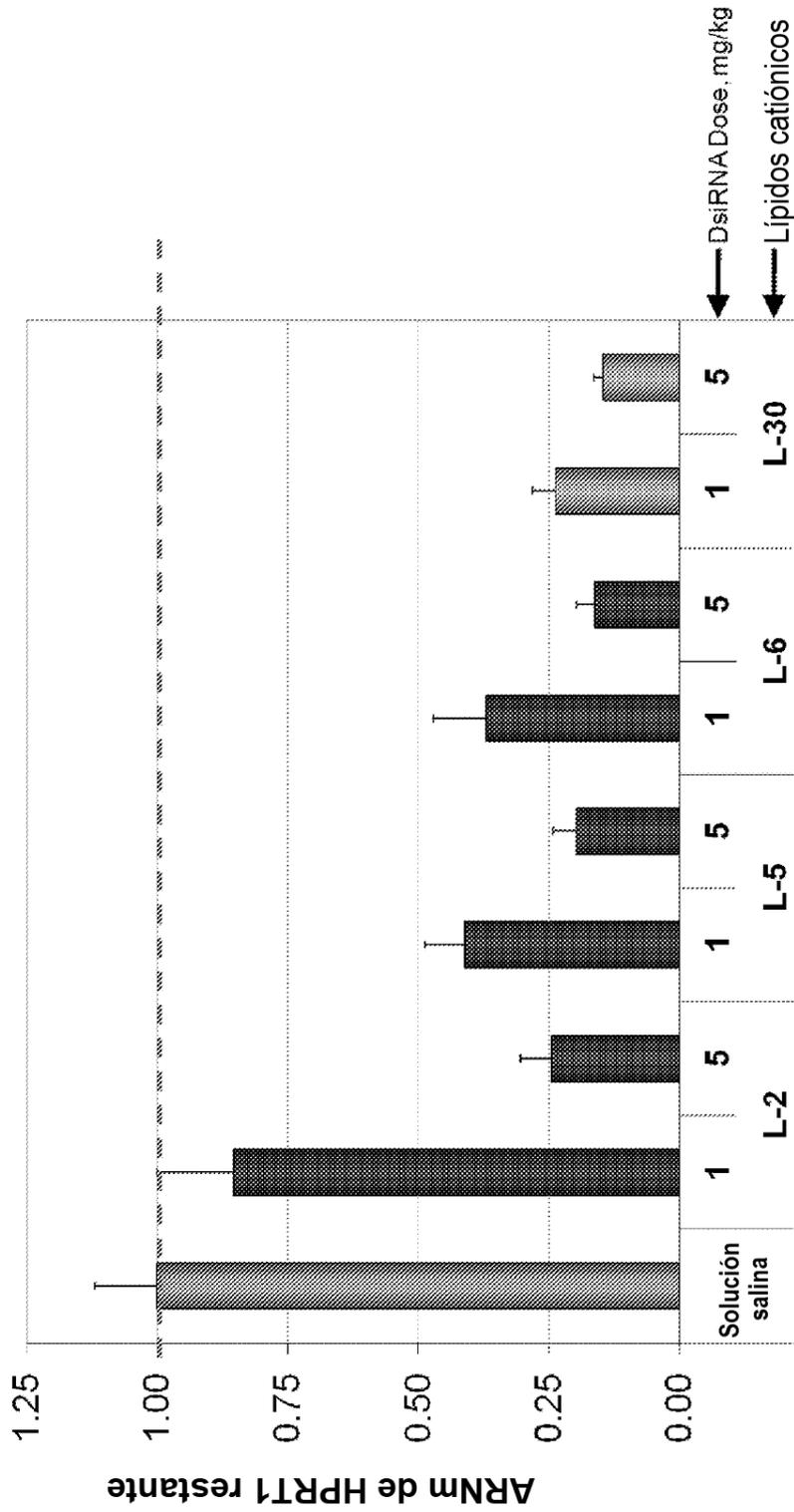


Figura 12

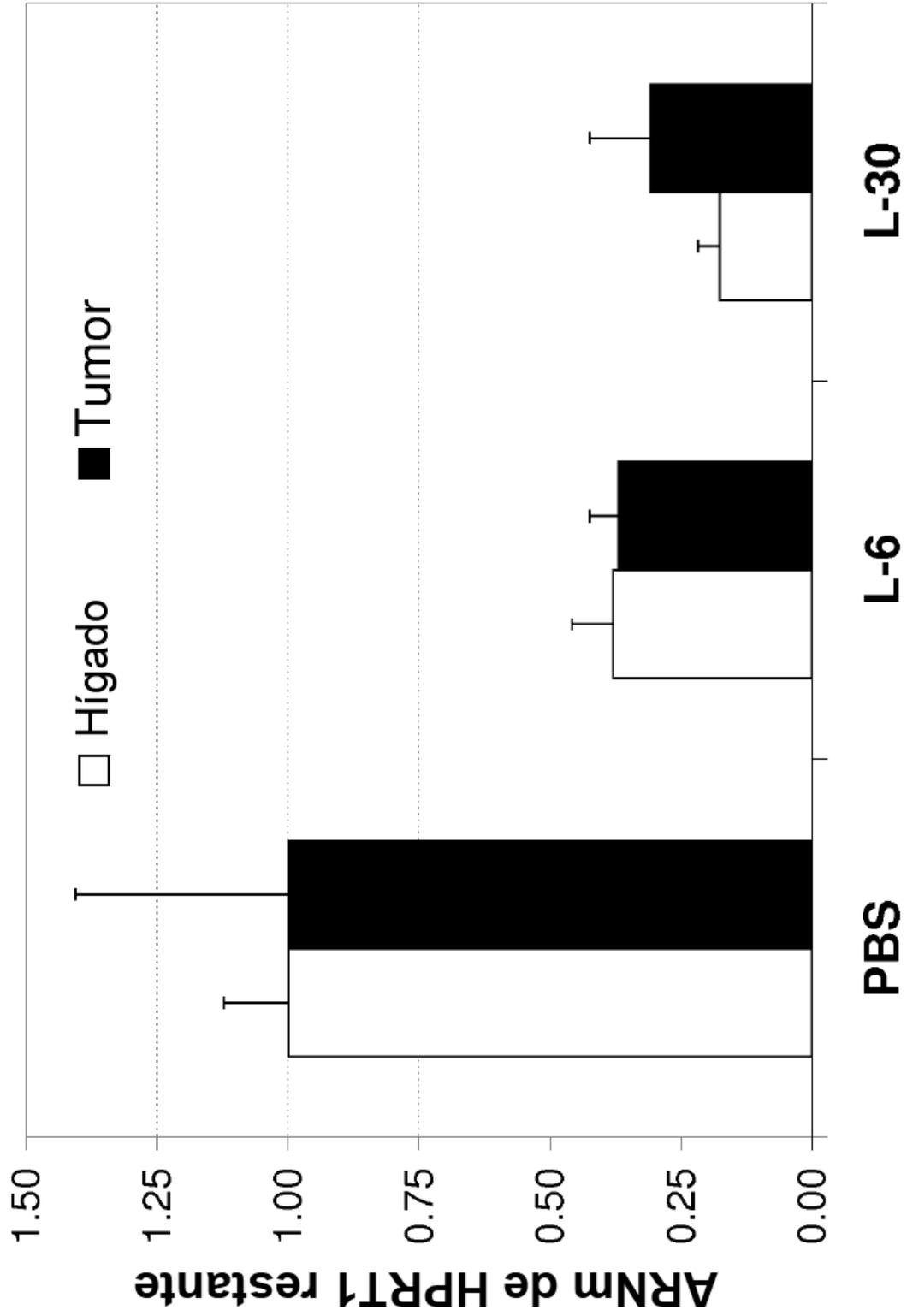


Figura 13

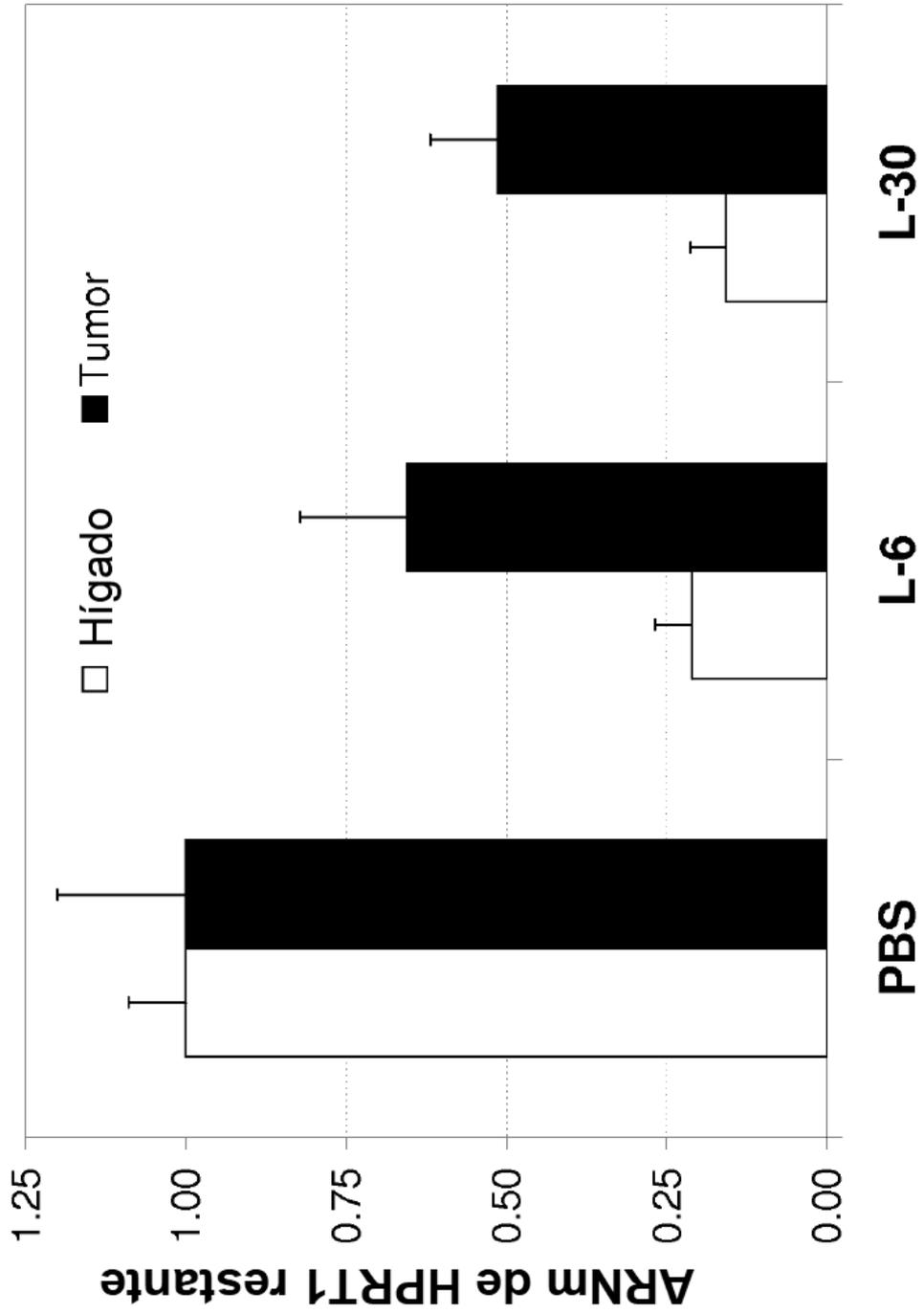


Figura 14

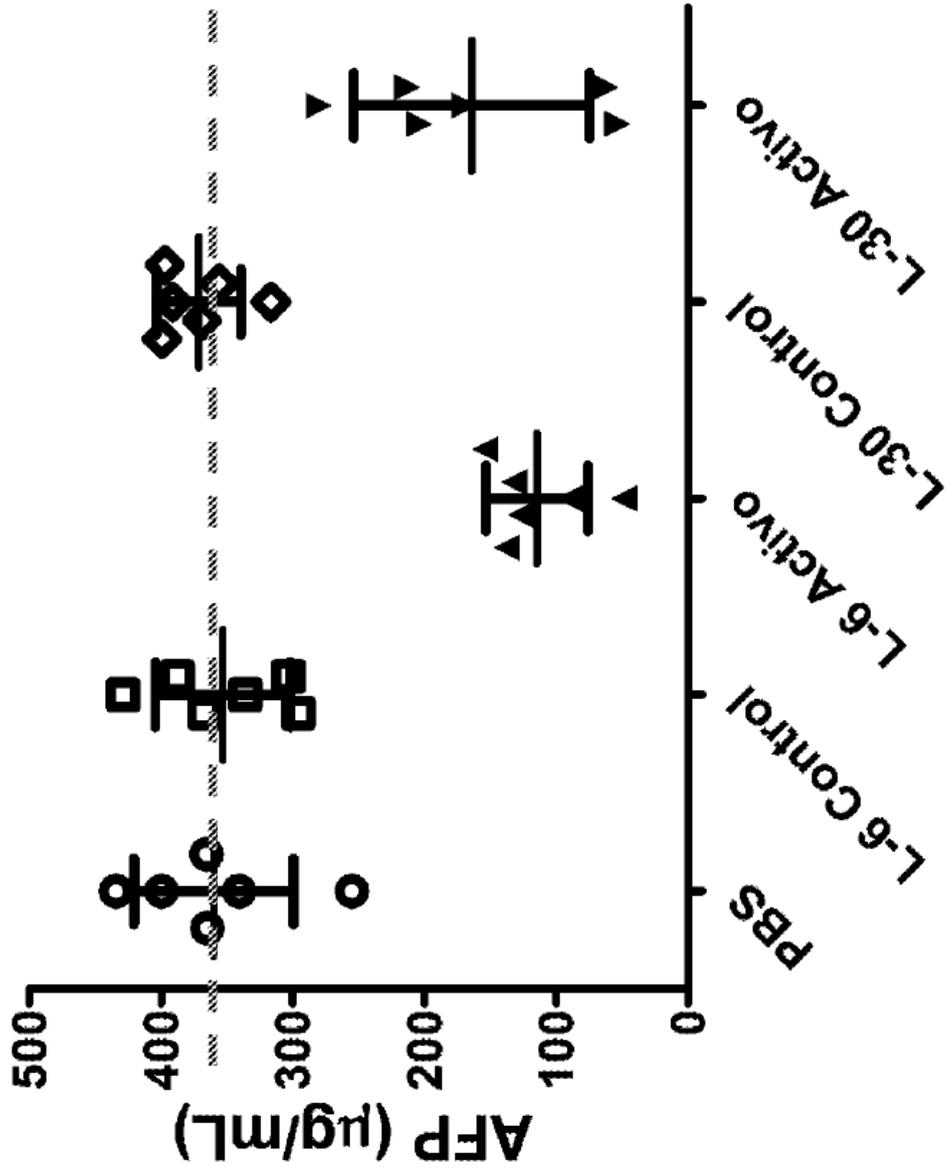


Figura 15

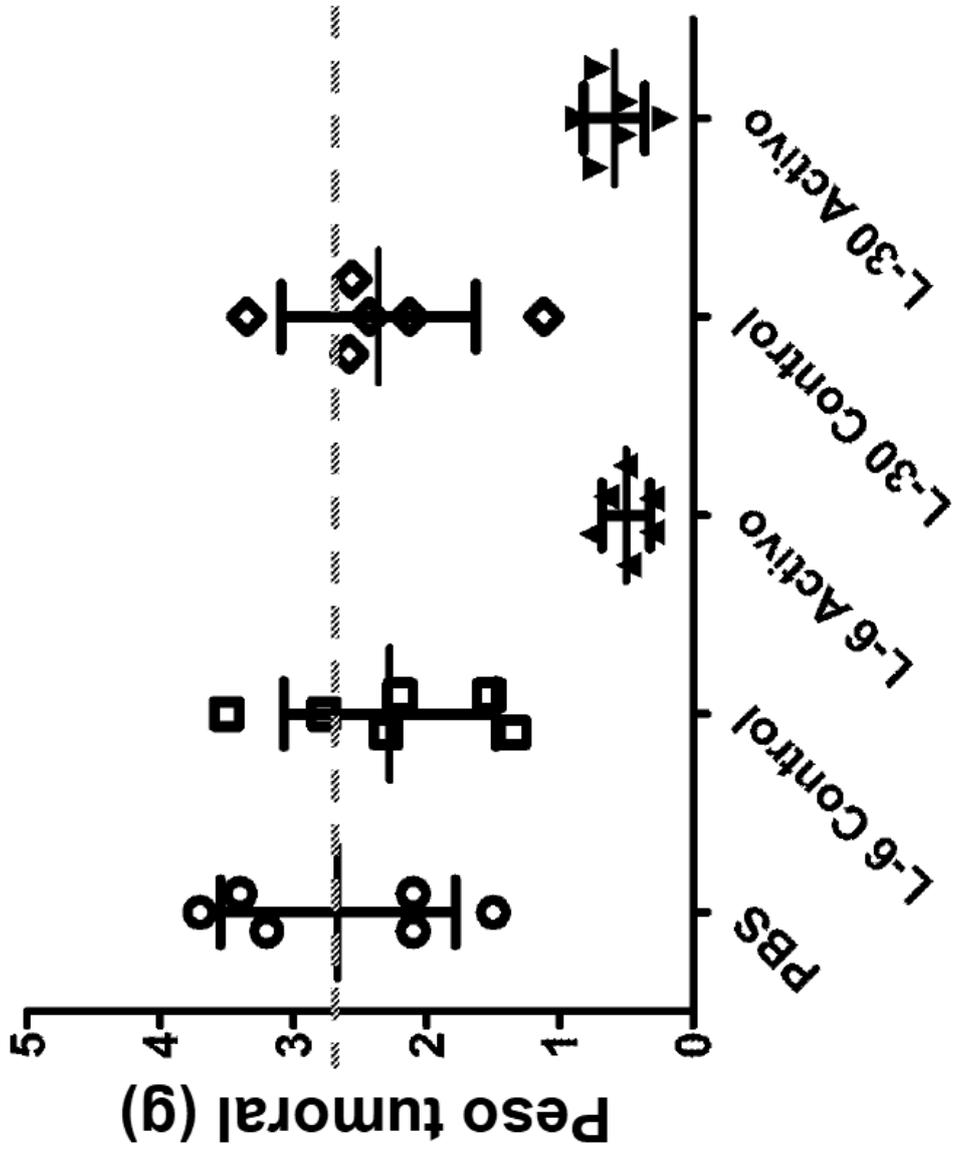


Figura 16

L-48

L-49

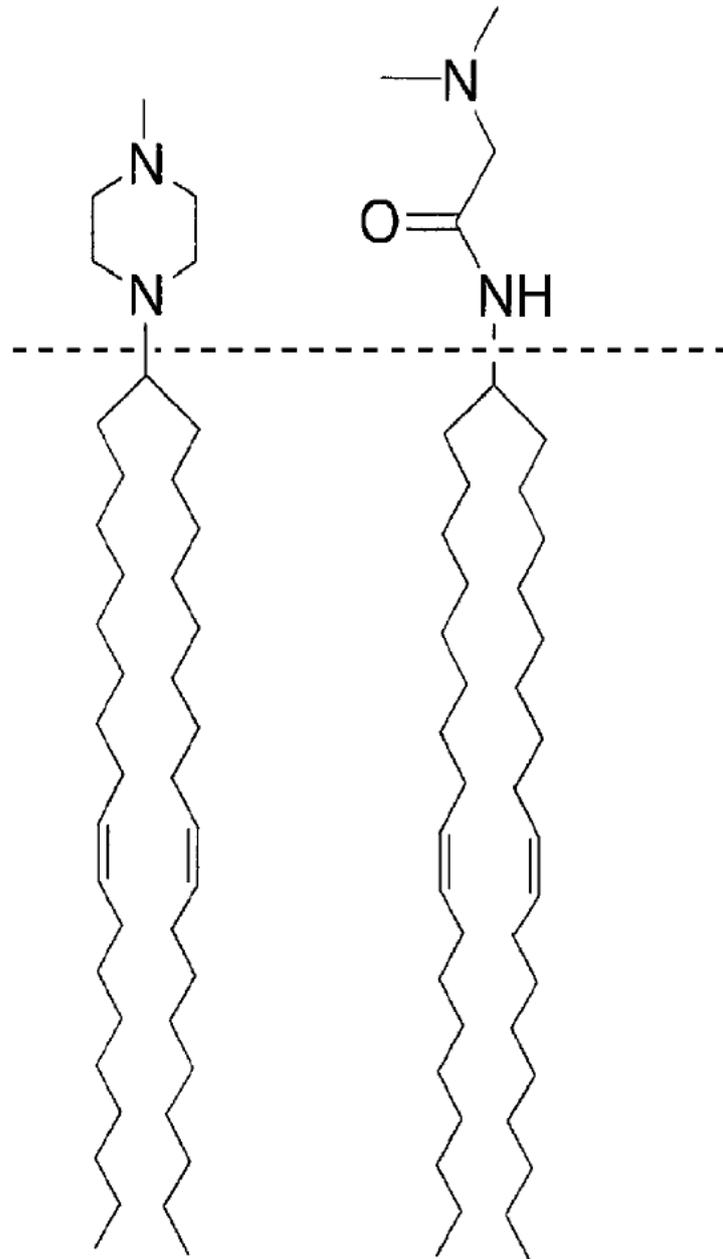


Figura 17

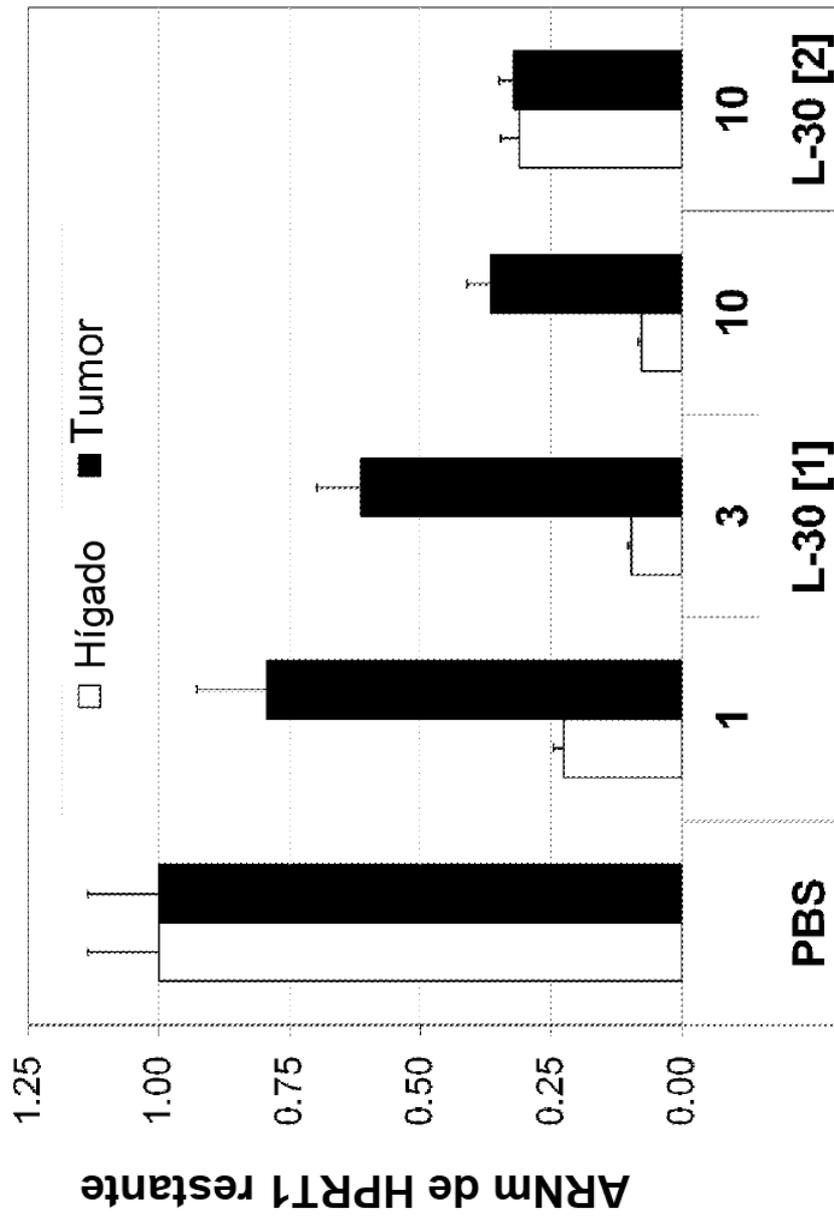


Figura 18

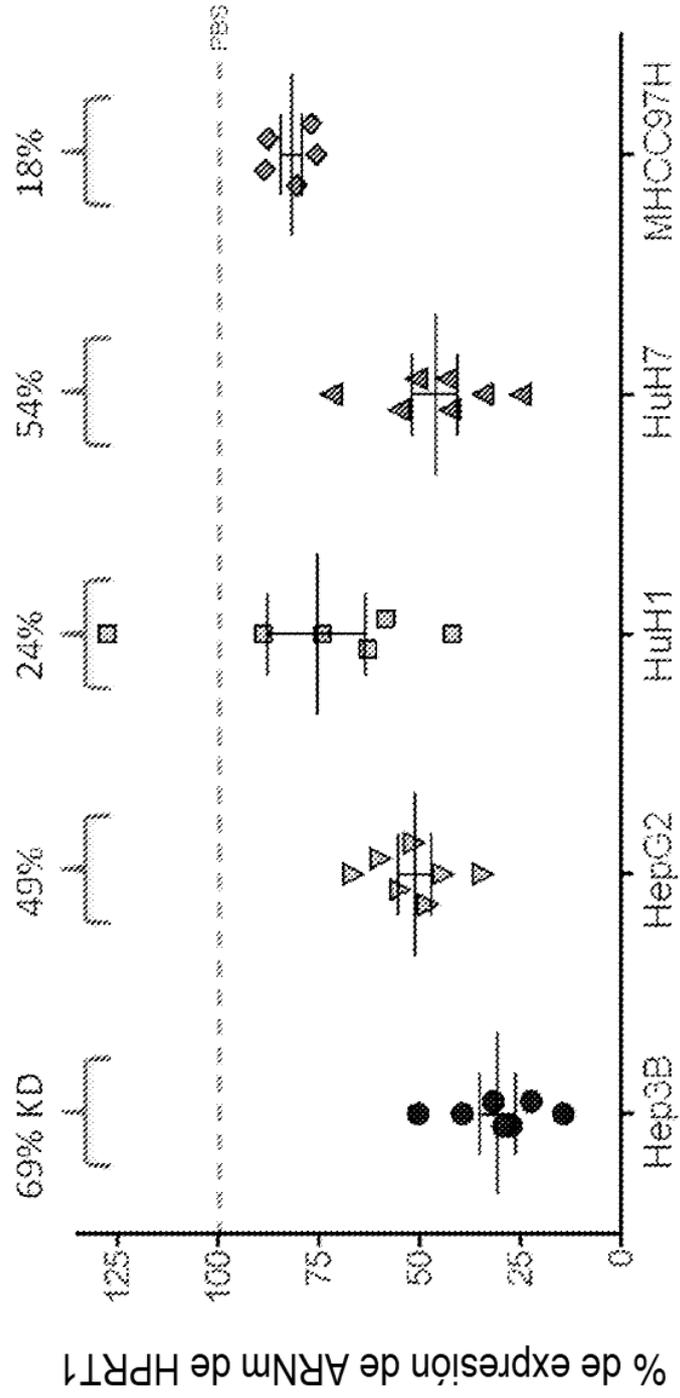


Figura 19

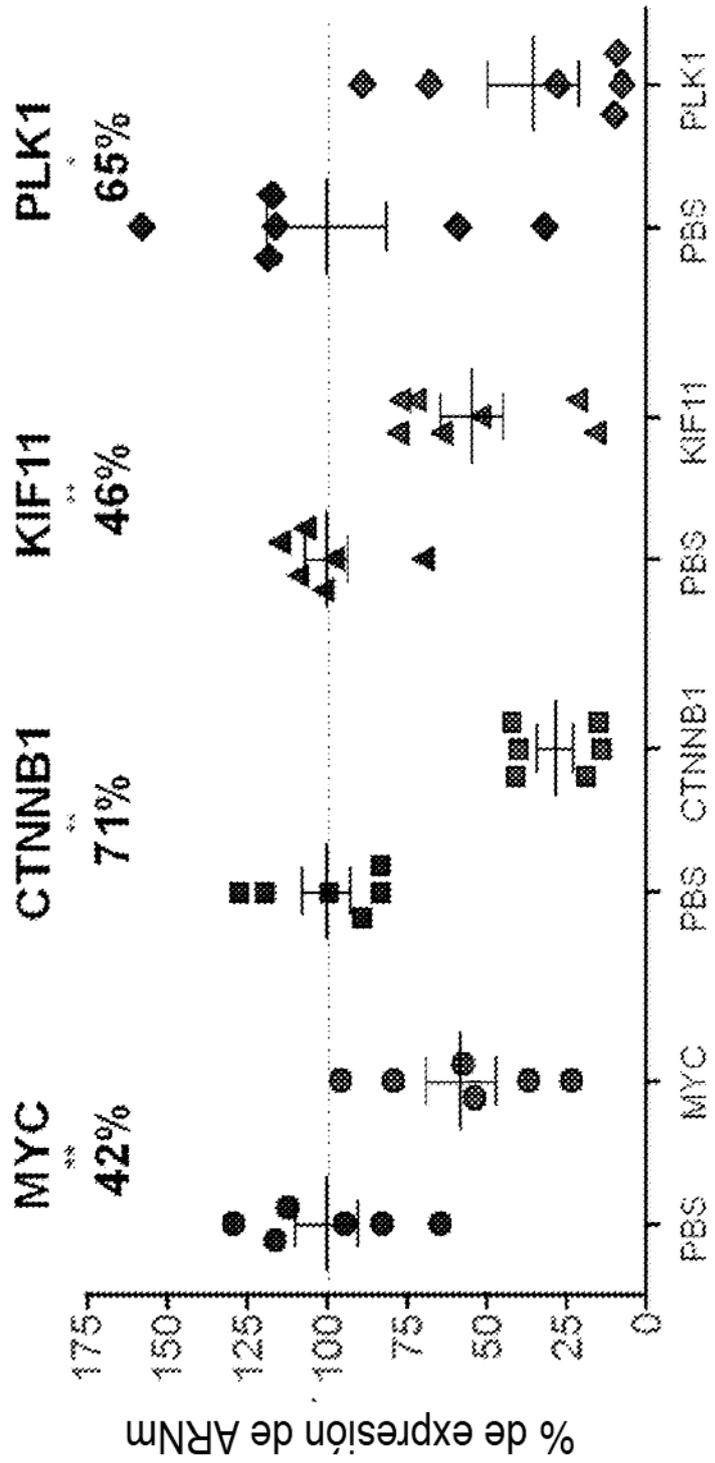


Figura 20

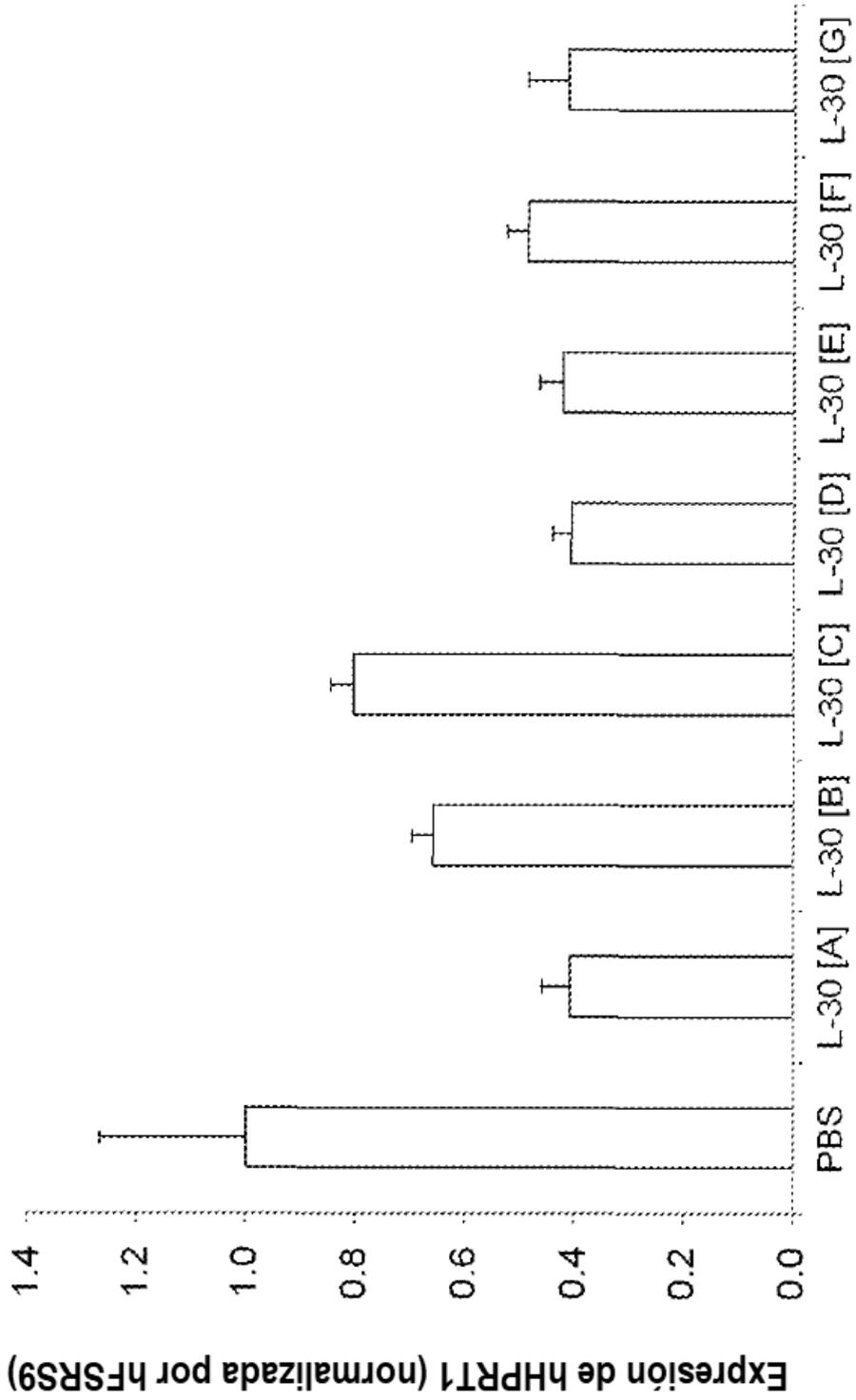


Figura 21

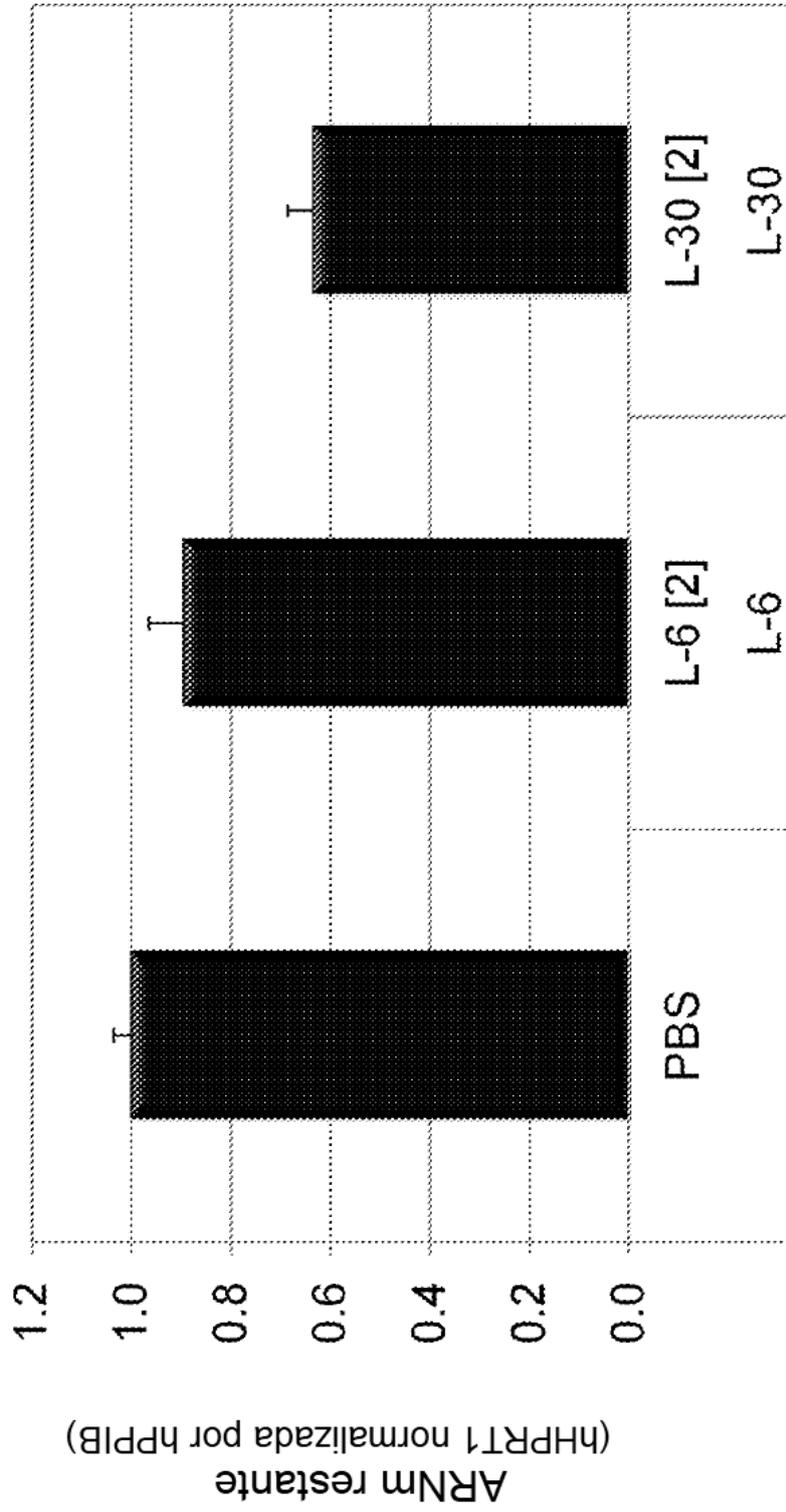


Figura 22

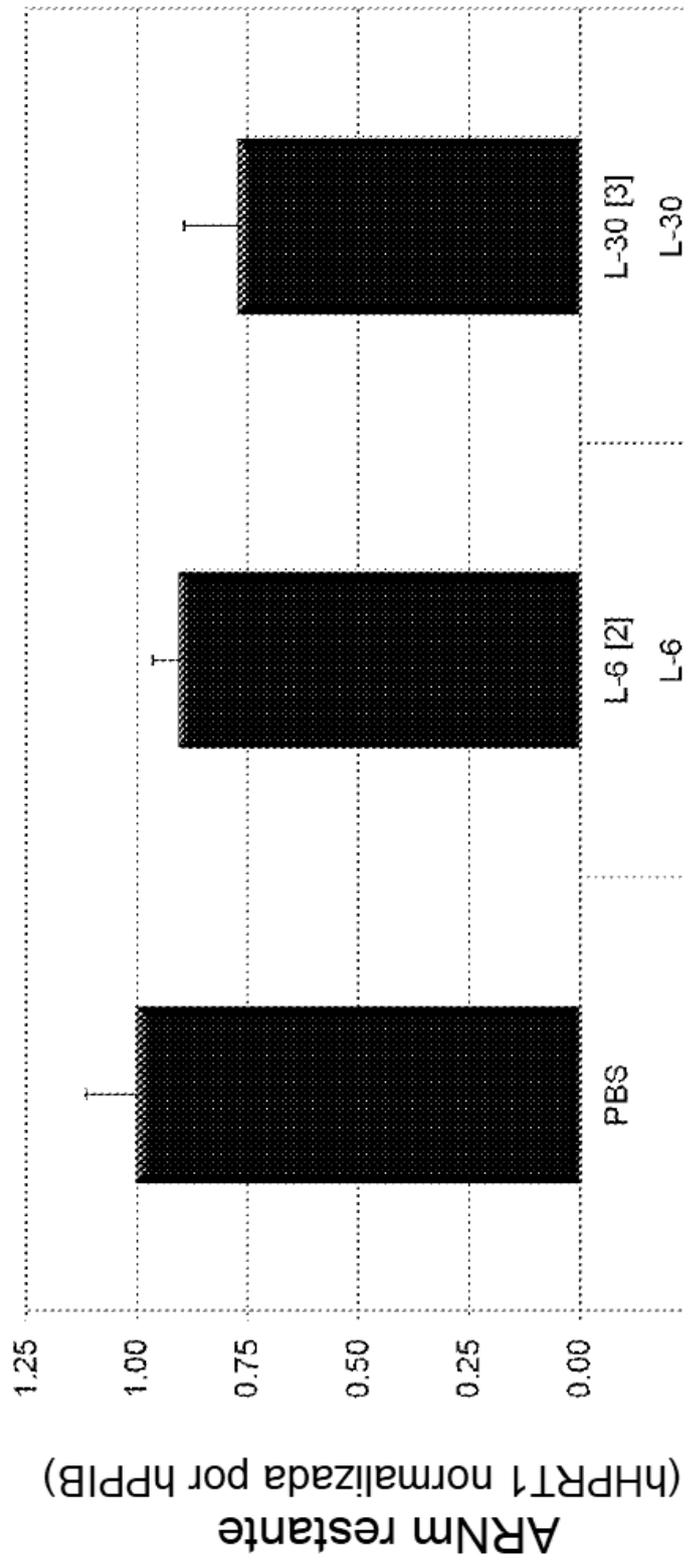


Figura 23

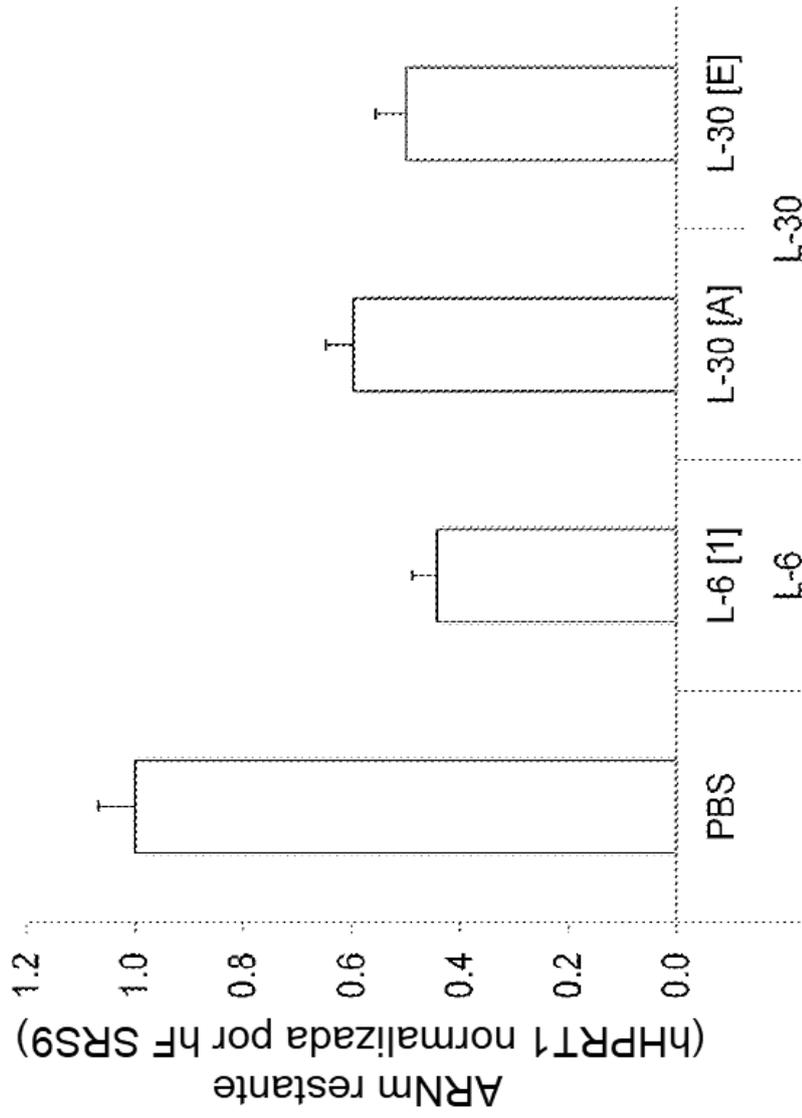


Figura 24